



**Gilberto José de
Castro Botelho**

**Investigação de técnicas de extracção de
óleo a partir de biomassa**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Mecânica, realizada sob a orientação científica do Prof. Doutor Eduardo Gil Simões dos Santos Cabral, Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha irmã e aos meus padrinhos por tudo o que eles significam para mim.

*“Um gênio é 1% de inspiração e 99% de transpiração”
(Thomas Edison)*

O júri

Presidente

Professor Doutor José Joaquim de Almeida Grácio

Professor Catedrático do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro

Arguente

Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves

Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Orientador

Prof. Doutor Eduardo Gil Simões dos Santos Cabral

Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Um especial agradecimento aos meus pais, que me concederam todas as condições e me apoiaram em todas as decisões tomadas.

Um agradecimento aos meus padrinhos pela amizade, confiança e encorajamento que sempre depositaram em mim.

Ao Professor Doutor Eduardo Gil Simões dos Santos Cabral, desejo expressar a minha sincera gratidão pela orientação científica desta dissertação, por todo o ensinamento, e pela amizade que me transmitiu ao longo deste período de trabalho.

Ao Professor Doutor José Joaquim de Almeida Grácio pelo convite feito para ingressar neste projecto.

A todos os colegas de laboratório, o meu sincero agradecimento pela amizade, ajuda e apoio, mas também pelo bom ambiente de trabalho que me proporcionaram.

Ao meu colega e amigo Paulo Neves um profundo agradecimento, por todo o apoio prestado, e pelas numerosas horas de trabalho realizadas em noites sem fim.

Por fim, às restantes pessoas que me apoiaram ao longo desta tese, o meu sincero agradecimento.

Palavras-chave

Biomassa, óleo, extracção, biodiesel, microalgas, ultra-sons, solventes.

Resumo

As energias renováveis, e em particular os biocombustíveis, são já hoje alternativas energéticas aos produtos petrolíferos, mais poluentes e cada vez mais escassos. Actualmente, grande parte do biodiesel provém de óleos produzidos a partir de culturas oleaginosas convencionais, como a colza, soja, girassol ou palma. Num futuro próximo, é provável que este biocombustível seja também produzido a partir de microalgas.

As microalgas possuem um teor em lípidos apreciável relativamente à sua biomassa seca e uma excelente produtividade por área de cultura. Todavia, a rentabilidade do uso do óleo das microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel, depende da eficiência dos passos de cultivo, recolha da biomassa e extracção de respectivos lípidos.

Assim, foi objectivo principal deste trabalho a investigação de técnicas de extracção de óleo a partir de biomassa de microalgas para posterior produção de biodiesel. Recorrendo à produção de microalgas em laboratório, consideraram-se vários solventes orgânicos e o recurso a diferentes sistemas de ultra-sons. Verificou-se que, independentemente do solvente empregue, a eficiência da extracção de óleos de biomassa seca de microalgas era superior em pelo menos 3% utilizando uma sonda de ultra-sons durante 15 minutos. O melhor solvente foi o clorofórmio, seguido do metanol, hexano e por fim o etanol, com extracções na ordem dos 25,5, 23, 21 e 19,3% respectivamente. Com base nestes resultados foi dimensionado um sistema de extracção de óleos em linha [contínuo] a partir de biomassa seca de microalgas com capacidade para processar 20 kg/ dia e o qual permite recuperação do solvente se necessário

Keywords

Biomass, oil, extraction, biodiesel, microalgae, ultra-sound, solvents.

Abstract

Renewable energies, namely biofuels, are today energetic alternatives to the fossil fuels, which are more pollutant and getting scarcer. Currently, most biodiesel derives from oils produced from conventional oleaginous cultures such as rape, soy, sunflower or palm. In a near future, it is likely that this biofuel may be produced from microalgae.

Microalgae possess a considerable amount of lipids relatively to its dry biomass and an excellent productivity by culture area. Nevertheless, the yield of microalgae oil use, as raw material for the production of biodiesel, depends on the efficiency of the microalgae cultivation, biomass harvesting and its oil extraction.

Since that, the main goal of this work was the investigation of oil extraction techniques from microalgae biomass, to forward biodiesel production. Several organic solvents and different ultrasound systems were evaluated on microalgae produced in laboratory. It was verified that, independently from which used solvent, the oil extraction efficiency from microalgae dry biomass was higher, in at least in 3%, using an ultrasound probe during 15 minutes. Chloroform was the best solvent used in oil extractions, followed by hexane, methanol and finally by ethanol, with extractions ranging, 25,5 e 23, 21 and 19,3% respectively. Based on these results, a continuous oil extraction system from microalgae dry biomass was designed, with capacity of processing 20 kg/day and able to recover the solvent if necessary.

Índice

Índice	1
Índice de Tabelas	5
Índice de Figuras	7
Objectivos do trabalho	9
Capítulo I.....	11
1 Situação energética.....	11
1.1 Biodiesel como combustível alternativo	14
1.2 Vantagens e desvantagens do biodiesel.....	15
1.3 Produtores de biodiesel.....	16
1.3.1 Produção de biodiesel na Europa	17
1.3.1.1 Produção de biodiesel na Alemanha.....	17
1.3.1.2 Produção de biodiesel na França	18
1.3.1.3 Produção de biodiesel na Itália	18
1.3.1.4 Produção de biodiesel em Portugal.....	19
1.4 Produção de biodiesel	20
1.4.1 Pirólise	20
1.4.2 Pulverização	21
1.4.3 Reacção de transesterificação	21
1.4.3.1 Reagentes da reacção de transesterificação	22
1.4.3.1.1 Glicerídeos.....	22
1.4.3.1.2 Álcool	22
1.4.3.2 Produtos da reacção	23
1.4.3.2.1 Biodiesel ou éster de alquilo	23
1.4.3.2.2 Glicerina	23
1.4.3.3 Catalizadores	24
1.4.3.3.1 Metanol supercrítico	24
1.4.3.3.2 Catalizadores enzimáticos.....	25
1.4.3.3.3 Catálise ácida	25
1.4.3.3.4 Catálise básica	25
1.5 Lavagem e purificação do biodiesel	26
1.6 Matérias-primas	27
1.7 Microalgas.....	30
1.7.1.1 Características das microalgas.....	33
1.8 Processos de extracção.....	34
1.8.1 Prensagem mecânica	34
1.8.2 Extracção por solventes orgânicos	35
1.8.2.1 Solventes orgânicos utilizados.....	36
1.8.2.1.1 n- Hexano.....	36
1.8.2.1.2 Clorofórmio	36
1.8.2.1.3 Etanol e metanol	37
1.8.2.2 Métodos de extracção através de solventes orgânicos	37
1.8.2.2.1 Método de Bligh & Dyer	38

1.8.2.2.2	Método de Folch	38
1.8.2.2.3	Método Hara & Radin.....	38
1.8.3	Extracção por CO ₂ supercrítico	39
1.8.4	Extracção por ultra-sons.....	39
1.9	Síntese	40
Capítulo II.....		43
2	Reagentes utilizados	43
2.1	Espécie cultivada	43
2.1.1	Cultura das microalgas em laboratório.....	44
2.1.2	Produção das microalgas “em massa”	46
2.1.2.1	Meio de cultura	47
2.1.2.2	Esterilidade dos processos de cultura	47
2.1.2.2.1	Esterilização de meios e material utilizados na cultura em laboratório	47
2.1.2.2.2	Processo de tratamento de água	48
2.1.2.2.3	Processo de tratamento do ar	49
2.1.2.2.4	Esterilização de meios e material utilizados na cultura “em massa”	50
2.1.2.3	Sistema de iluminação	51
2.1.2.4	Monitorização da cultura de algas	52
2.1.2.4.1	Peso seco.....	52
2.1.2.4.2	Densidade células.....	52
2.1.2.4.3	A absorvância a 750 nm.....	53
2.2	Processamento da biomassa.....	53
2.2.1	Centrifugação	53
2.2.2	Secagem da biomassa.....	54
2.2.2.1	Estufa.....	54
2.2.2.1.1	Armazenamento do material seco	55
2.3	Processos de extracção.....	56
2.3.1	Solventes utilizados.....	58
2.3.2	Procedimentos iniciais.....	59
2.3.2.1	Determinação do melhor método de extracção.....	59
2.3.2.2	Seleção do melhor solvente orgânico.....	60
2.3.2.3	Determinação do melhor tempo de extracção.....	60
2.3.3	Procedimento experimental.....	61
2.3.3.1	Quantificação do óleo extraído através de cada solvente.....	61
Capítulo III.....		63
3	Resultados da cultura da microalga <i>Chlorella</i>.....	63
3.1	Resultados da centrifugação	66
3.2	Secagem da biomassa.....	67
3.3	Determinação do melhor aparelho de ultra-sons.....	68
3.4	Extracções com diferentes solventes orgânicos	69
3.5	Optimização do tempo de extracção	73
3.6	Análise visual dos óleos extraídos com diferentes solventes.....	74
Capítulo IV		77
4	Apresentação do sistema de extracção	77
4.1	Sistema de extracção	78

4.2	<i>Principio de funcionamento do sistema de extracção</i>	79
4.3	<i>Controlo do sistema de extracção</i>	81
4.4	<i>Funcionamento automático do sistema de extracção</i>	82
	<i>Capítulo V</i>	85
5	<i>Conclusões</i>	85
5.1	<i>Trabalhos futuros</i>	86
	<i>Referências e Bibliografia</i>	87
	<i>Anexos</i>	91

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Produção de biodiesel EU-25 (ton).....	17
Tabela 2 - Comparação das várias matérias-primas para produção de biodiesel.	31
Tabela 3 - Percentagem de óleo de algumas espécies de microalgas	32
Tabela 4 - Propriedades do dispositivo de esterilização por UV.	48
Tabela 5 - Especificações dos filtros de ar.....	49
Tabela 6 - Parâmetros físicos dos solventes utilizados.....	58
Tabela 7 - Parâmetros monitorizados durante os ensaios de extracção.	69
Tabela 8 - Componentes utilizados no sistema de extracção.....	77

Índice de Figuras

Fig. 1 - Relação entre a produção de hidrocarbonetos líquidos e a população no século XX.	11
Fig. 2 - Consumo energético por sector na Europa (entre 1990 e 2004).	13
Fig. 3 - Produção mundial de biodiesel.	16
Fig. 4 - Reacção de transesterificação.....	21
Fig. 5 - Sementes de colza.	27
Fig. 6 - Sementes de soja.	27
Fig. 7 - Sementes de palma.	27
Fig. 8 - Girassol.....	27
Fig. 9 - Sementes de mamona.	27
Fig. 10 - Sementes de dendê.	27
Fig. 11 - Evolução do preço de palma, soja, colza e girassol.	29
Fig. 12 - Prensa mecânica	34
Fig. 13 - Representação do processo de cultura em laboratório.	44
Fig. 14 - Garrafão com 4,5 litros de cultura de <i>Chlorella vulgaris</i> que servirá de inóculo.	45
Fig. 15 - Representação esquemática da produção em massa.	46
Fig. 16 - Dispositivo de esterilização por UV.....	48
Fig. 17 - Filtros de ar.....	49
Fig. 18 - Armário de cultura.	50
Fig. 19 - Distribuição espectral de energia.	51
Fig. 20 - Grelha de contagem da câmara de Neubauer <i>Improved</i>	52
Fig. 21 - Estufa de ventilação livre. Aspecto exterior e estufa aberta com placas de Petri	54
Fig. 22 - Placa de Petri com material húmido e após à secagem.	55
Fig. 23 - Placas de Petri com material seco e desagregado.	55
Fig. 24 - Banho de ultra-sons.	56
Fig. 25 - Sonda de ultra-sons e respectiva consola.	58
Fig. 26 - Biomassa triturada num almofariz.	59
Fig. 27 - Monitorização da cultura de <i>Chlorella</i> ao longo do tempo (densidade celular). ..	64
Fig. 28 - Monitorização da cultura de <i>Chlorella</i> ao longo do tempo (peso seco).	64
Fig. 29 - Amostras secas à temperatura de 45 e 65 °C respectivamente.....	67

Fig. 30 - Comparação da variação do peso da biomassa antes e após a extracção com clorofórmio.....	68
Fig. 31 - Variação do peso da biomassa antes e após a extracção com diferentes solventes orgânicos.	70
Fig. 32 - Extracção realizada com hexano, etanol e metanol para vários tempos de operação.	73
Fig. 33 - Resíduo resultante da evaporação do metanol com árgon.....	75
Fig. 34 - Resíduo resultante da evaporação do etanol com árgon.....	76
Fig. 35 - Resíduo resultante da evaporação do n-hexano com árgon.....	76
Fig. 36 - Aspecto geral do sistema de extracção.	78
Fig. 37 - Depósito de pesagem e respectiva célula e carga. Recipiente de 2L, cilindro, porta guilhotina aberta, e respectivas electroválvulas	79
Fig. 38 - Misturador, câmara de ultra-sons e respectiva sonda.	80
Fig. 39 - Diagrama de blocos representativo do funcionamento do sistema de extracção. .	81

Objectivos do trabalho

Actualmente grande parte da população mundial vive de uma forma directa ou indirecta, energeticamente dependente do petróleo produzido em poucos países. A cada ano que passa o consumo aumenta e as reservas diminuem, implicando um aumento nos preços da gasolina, diesel e derivados de petróleo. Além do problema físico (diminuição das reservas), há o problema político que força com que a cada ameaça de guerra ou crise internacional o preço do “ouro negro” dispare consideravelmente. Para além da diminuição das reservas do petróleo, existe ainda o problema do efeito estufa que deixa o planeta mais quente devido ao aumento de dióxido de carbono na atmosfera.

É neste contexto que surge a motivação e o interesse de desenvolver novas técnicas e métodos de modo a minimizar a dependência possível dos combustíveis fósseis. É no contexto das mudanças climáticas e nas constantes subidas do preço do barril de petróleo que os biocombustíveis são agora apresentados como uma alternativa aos combustíveis fósseis, em particular o bioetanol e o biodiesel. O biodiesel com características comparáveis ao gasóleo é produzido a partir de óleos ou gorduras. Grande parte do biodiesel produzido hoje provém de culturas agrícolas vegetais, no entanto num futuro não muito longínquo é provável que se venha a utilizar outra fonte de matéria-prima. Efectivamente, parte da investigação feita hoje em biodiesel centra-se nas microalgas e na sua particular riqueza em óleo, e cujo rendimento da cultura por hectare é consideravelmente mais elevado que a colza ou girassol. Potencialmente, as algas cultivadas num hectare, num ano, podem produzir 19 a 57mil litros de biodiesel quando cultivadas em condições de crescimento optimizado, ou seja, em fotobiorreactores. Adicionalmente, o óleo obtido a partir de microalgas não compete com a produção agrícola alimentar.

A extracção do óleo é um passo importante que afecta directamente a viabilidade económica do processo. A extracção do óleo a partir de microalgas pode ser realizada por processos mecânicos que são mais económicos mas que têm menores rendimentos, ou por solubilização dos óleos em solventes orgânicos com posterior recuperação dos mesmos. A utilização de solventes apresenta maior rendimento mas tem como desvantagens a toxicidade e os riscos

de manuseamento. Para além disso, o uso de solventes pode tornar necessário um passo de separação do solvente/óleo com consumo de energia.

O objectivo deste trabalho consiste em desenvolver um método simples e eficiente de extracção de óleo a partir de biomassa de microalgas, que apresente um bom rendimento sem no entanto ser particularmente tóxico ou requerer dispendiosos passos de separação, e que seja compatível com a produção de biodiesel e valorização da biomassa.

Capítulo I

O presente capítulo tem como objectivo caracterizar a utilização dos combustíveis fósseis a nível nacional e internacional. Este capítulo visa ainda apresentar os biocombustíveis, nomeadamente o biodiesel, como alternativas à utilização de combustíveis fósseis. São abordados os principais processos para se obter biodiesel assim como as diferentes matérias-primas correntemente utilizadas. Destaca-se ainda a utilização das microalgas como matéria-prima por excelência, bem como vários métodos de extracção do respectivo óleo.

1 Situação energética

Vive-se actualmente num panorama global de instabilidade política e social, os problemas relacionados com as alterações climáticas estão a manifestar-se, a explosão demográfica e económica de países em desenvolvimento como a Índia e China só tende a agravar essa tendência. Existem tensões em locais críticos como o Médio Oriente, Venezuela, Rússia (todos eles exportadores de petróleo e gás natural) e que fazem crescer a preocupação dos países não produtores “a chamada segurança energética”.

O petróleo foi o grande impulsionador do desenvolvimento da civilização do século XX. As suas características - alta densidade energética, fácil transporte, extracção barata e grande diversidade de aplicações permitiram evoluir a uma taxa sem precedentes na história da humanidade. Pela observação da Fig. 1 ^[1], verifica-se existir uma relação entre a produção de hidrocarbonetos e a população mundial.

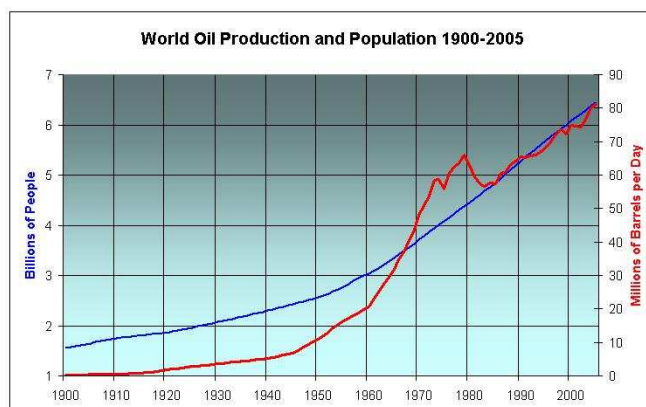


Fig. 1 - Relação entre a produção de hidrocarbonetos líquidos e a população no século XX.

Durante muito tempo, o petróleo de tão abundante que era, era visto como um recurso inesgotável. Apenas com a crise petrolífera dos anos 70 se começou a gerar a ideia que um dia este recurso energético poderia acabar. Mesmo conscientes que este recurso energético terá o seu fim, os consumos mundiais de petróleo aumentam de ano para ano. Em Julho de 2006 o consumo mundial de petróleo era cerca de 85 milhões de barris por dia ^[2] face aos 80 milhões produzidos em 2003, dos quais 20 milhões foram consumidos pelos Estados Unidos da América (EUA) ^[3].

A chegada ao pico de produção mundial do petróleo apresenta um problema de gestão energética sem precedentes para os países mundiais. À medida que esse pico se aproxima, os preços dos combustíveis líquidos aumentará dramaticamente e, sem medidas atenuantes atempadas, os custos económicos sociais e políticos serão tremendos. A questão energética preocupa indistintamente todos os países mundiais, desde os caracterizados pelo sector produtivo primário, aos chamados países industrializados. O que diverge entre eles é a capacidade de investir, este é o diferenciador que torna vulneráveis as economias em desenvolvimento que, para crescer, necessitam de energia e para gerá-la necessitam de recursos financeiros.

Portugal é um país com escassos recursos energéticos próprios, nomeadamente, aqueles que asseguram a generalidade das necessidades da maioria dos países desenvolvidos (como o petróleo, o carvão e o gás). Segundo dados divulgados pela petrolífera BP, relativos ao ano de 2004, o país ocupava o terceiro pior lugar no ranking da União Europeia (UE) em termos de eficiência energética. Portugal utiliza cerca de 0,88 barris de crude para produzir mil euros de riqueza, enquanto a vizinha Espanha precisava de pouco mais de 0,75 barris. A Alemanha e a França só necessitam de 0,44 barris ^[4]. Segundo um estudo divulgado pela Eurostat (Gabinete de Estatísticas da União Europeia) em 2006, concluía que Portugal (em 2005) era o segundo país da UE com maior taxa de dependência energética. Segundo as contas do Eurostat, a dependência nacional chegou aos 99,4% em 2005, valor só ultrapassado pelos 105,5% do Chipre, face à média europeia de 56,2% ^[5]. Em consequência destes resultados, as nossas empresas têm vindo a perder competitividade e os consumidores poder de compra. Neste contexto, Portugal necessita tomar medidas urgentes para reduzir o consumo e dependência do crude, bem como aumentar a sua eficiência energética, a fim de evitar problemas económicos mais graves. Grande parte dessas medidas terão como alvo o sector dos transportes. Afinal, o

“grande consumidor de petróleo é aquele em que se verificam grandes desperdícios energéticos”, conforme defende Nuno Ribeiro da Silva, ex-secretário de Estado da Energia ^[5]. Actualmente existem cerca de 800 milhões de veículos rodoviários em todo o mundo, existindo no entanto projecções, para que este valor atinja os 2 biliões em 2050 ^[6]. Como pode ser observado na Fig. 2 ^[7], o sector dos transportes na Europa é responsável por consumir aproximadamente 30% da energia total consumida no velho continente.

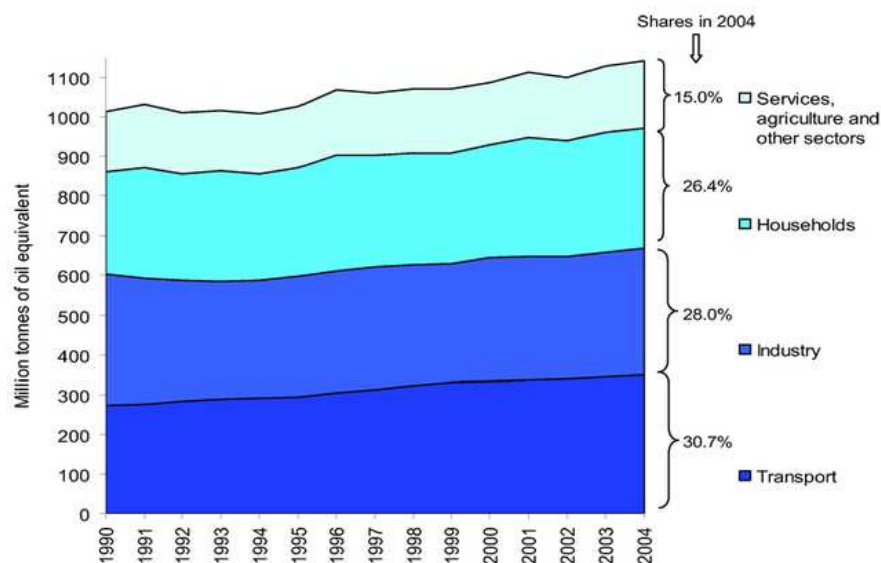


Fig. 2 - Consumo energético por sector na Europa (entre 1990 e 2004).

Segundo as estatísticas da ACAP (Associação do Comércio Automóvel de Portugal) o número de veículos terrestres no nosso país ultrapassa os 5 milhões ^[8]. A utilização de combustíveis fósseis é uma das principais causas de emissões para a atmosfera de dióxido de carbono (CO₂), o mais significativo dos gases com efeito de estufa (GEE). Ao assinar o Protocolo de Quioto, a Europa assumiu reduzir os GEE em 8% relativamente a 1990 durante o período de 2008-2012. A localização geográfica e a situação económico-social dos diversos estados membros, implica esforços diferentes. O esforço solicitado a Portugal não é o mesmo que é pedido à Alemanha ou ao Reino Unido. Com a adesão ao Protocolo de Quioto, Portugal assumiu, no contexto da co-responsabilidade no seio da UE, uma contenção no crescimento das emissões para o período de 2008-2012 de um máximo de 27% relativamente a 1990. O acréscimo dessas emissões, à data actual, ultrapassa significativamente este limiar, o que implica para o futuro, um esforço acrescido na redução da intensidade carbónica da economia portuguesa ^[9].

Face ao cenário que o mundo atravessa, é estritamente necessário providenciar-se a substituição dos combustíveis derivados do petróleo por outros mais baratos e até com menos impacto ambiental. Neste contexto, têm sido estudadas várias possibilidades para contrariar as tendências actuais, nomeadamente a utilização de combustíveis alternativos como os biocombustíveis. Os biocombustíveis têm sido promovidos através de decisões políticas a nível nacional e internacional, desde os Estados Unidos da América, Brasil, Colômbia, Estados-Membros da UE até ao estado Australiano ^[10].

Na União Europeia, o biodiesel é o biocombustível com maior relevância, representando 82% da produção de biocombustíveis ^[11]. Tal como em toda a Europa, também em Portugal o consumo de gasóleo é muito superior ao consumo da gasolina. O consumo português de gasóleo aumentou 180% face ao consumo da gasolina entre 1990 e 1994 ^[12], tornando assim a produção de biodiesel uma aposta promissora para o futuro. Os problemas energéticos e o aquecimento global são talvez os maiores testes que a humanidade alguma vez enfrentou. As novas tecnologias são promissoras mas implicam actos conscientes ^[13].

1.1 Biodiesel como combustível alternativo

Biodiesel é o nome de um combustível alternativo de combustão limpa, produzido a partir de óleos vegetais ou gorduras animais, portanto matérias-primas renováveis. O biodiesel apesar de não ser de origem mineral como o gasóleo, pode ser adicionado ao mesmo formando uma mistura, a qual é utilizável em motores de ignição a compressão (diesel) sem necessidade de modificação. O biodiesel é biodegradável, não tóxico e, essencialmente, livre de compostos sulfurados e aromáticos. Mundialmente passou-se a adoptar uma nomenclatura única para identificar a concentração do biodiesel na mistura com gasóleo mineral. Assim a mistura BXX, representa um gasóleo cuja percentagem em volume de XX é biodiesel. Por exemplo, o B2, B5, B20 e B100 são gasóleos com uma concentração de 2%, 5%, 20% e 100% de biodiesel respectivamente ^[14].

1.2 Vantagens e desvantagens do biodiesel

Sendo o biodiesel produzido a partir de fontes renováveis, a sua combustão e o processo de produção deveriam ter idealmente o menor impacto no ambiente. Estudos efectuados, revelaram que a utilização de biodiesel ou de misturas deste com o diesel fóssil como combustível apresenta as seguintes vantagens ^[15]:

- É uma energia renovável.
- É de fácil transporte, fácil armazenamento e mais seguro comparativamente aos combustíveis fósseis como o diesel ou o gás natural.
- Pode ser utilizado directamente em motores diesel de injeção directa, sem necessidade de adaptação do motor.
- O desempenho dos motores não regista diferenças significativas na utilização de biodiesel em relação ao diesel fóssil.
- Contribui para a diminuição das emissões de gases com efeito de estufa.
- Os gases provenientes da combustão não contêm SO_x, principais causadores das chuvas ácidas.
- Redução na emissão de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (alguns destes compostos são considerados cancerígenos).

Além de apresentar vantagens significativas que promovem a utilização de biodiesel, o uso deste biocombustível apresenta também alguns inconvenientes ^[15]:

- Custos elevados de produção tornam o biodiesel pouco competitivo.
- Pode causar dissolução da pintura dos automóveis sendo necessário utilizar tintas resistentes.
- Pode provocar a corrosão de componentes de borracha dos motores.
- Pode também dissolver ou plastificar o asfalto das estradas.
- Aumento nas emissões de aldeídos e de NO_x.

1.3 *Produtores de biodiesel*

O biodiesel surgiu mundialmente como uma alternativa promissora aos combustíveis minerais, derivados do petróleo. O carácter renovável torna o produto numa fonte importante de energia a longo prazo. Este biocombustível tem vindo a ser testados em várias partes do mundo. Países como Argentina, Estados Unidos, Malásia, Alemanha, França e Itália já produzem biodiesel comercialmente, estimulando o desenvolvimento da produção para a escala industrial. No início dos anos 90, o processo de industrialização do biodiesel foi iniciado na Europa. Assim, apesar de ter sido desenvolvido no Brasil, actualmente o principal mercado produtor e consumidor de biodiesel em grande escala é a Europa ^[14].

Em 2003 a produção mundial de biodiesel foi cerca de 1,8 biliões de litros. A Fig. 3 ^[11] é representativa do crescimento da produção de biodiesel desde 1991 até 2003.

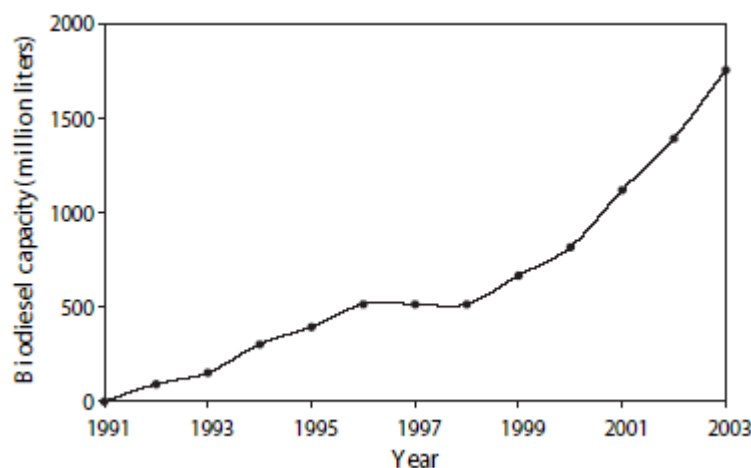


Fig. 3 - Produção mundial de biodiesel.

Na Europa (EU-25), a produção de biodiesel assenta sobretudo em 9 países que se encontram destacados na Tabela 1 ^[11]. A produção de biodiesel em 2003 foi de 1,504 milhões de toneladas, produzidos especialmente pela Alemanha (com cerca de 40% da produção), França e Itália ^[16]. A produção de biodiesel na Europa utiliza cerca de 1,4 milhões de hectares de terra arável, em diversas fábricas, no entanto, o número de fábricas responsáveis pelo processamento da matéria-prima e produção de óleo é muito superior, encontrando-se localizadas principalmente na Alemanha, Itália, Áustria, Republica Checa, França e Suécia ^[16].

Tabela 1 - Produção de biodiesel EU-25 (ton)

País	2002	2003
Alemanha	450000	715000
França	366000	357000
Itália	210000	273000
Republica Checa	68800	70000
Dinamarca	10000	41000
Áustria	25000	32000
Reino Unido	3000	9000
Espanha	-	6000
Suécia	1000	1000
Total	1133800	1504000

1.3.1 Produção de biodiesel na Europa

A Europa, ao contrário dos Estados Unidos ratificou o protocolo de Quioto e esforça-se por implementar políticas que permitam respeitar o compromisso de reduções das emissões de gases efeito de estufa e, ao mesmo tempo, diminuir a dependência face o petróleo. O objectivo pretendido para a União Europeia, visa a substituição de 2% dos combustíveis fósseis utilizados para transportes em 2005, 5,75% em 2010 e 20% em 2020 ^[16]. De momento, porém, a União Europeia não está a cumprir as suas metas. Em 2005 deveria ser atingido um registo de 2% de biocombustíveis no mercado da gasolina e do gasóleo para os transportes, mas o valor real em 2006 cifrava-se em 1,8% ^[17]. Para atingir tais objectivos, os países europeus nomeadamente a Alemanha, França e Itália, aplica isenções fiscais sobre os biocombustíveis tornando-os competitivos relativamente aos combustíveis fósseis.

1.3.1.1 Produção de biodiesel na Alemanha

A Alemanha cuja principal matéria-prima para o biodiesel é o óleo de colza ^[18] atingiu uma capacidade de produção de 1,06 milhões de toneladas em 2004, apresentando uma comercialização de 1 milhão de toneladas. Em 2005 o país germânico produziu 1,8 milhões de litros, mantendo-se assim o maior produtor de biodiesel na Europa ^[18]. Em Janeiro de 2004, existiam cerca de 1800 postos de abastecimento de biodiesel. A Alemanha é ainda o único país da UE que vende biodiesel puro (B100) devido a isenção fiscal de que beneficiam os combustíveis de origem não mineral ^[18]. No entanto a médio prazo a produção de biodiesel

deixará de ser sustentável, uma vez que as culturas para produção de biocombustíveis competem com as culturas alimentares penalizando o preço dos alimentos. É diversas vezes defendido, que as terras actualmente retiradas para pousio eram suficientes para a produção de culturas energéticas, como colza para o biodiesel. Em 2005, na Alemanha, foram utilizados 317.000 hectares de pousio para cultivo de colza, porém, a produção de biodiesel requer 680.000 hectares. Assim, cerca de metade das plantações de colza para produção de biodiesel na Alemanha irá “ocupar” terras de cultivo que poderiam ser utilizadas para outros fins ^[16].

1.3.1.2 Produção de biodiesel na França

A produção de biodiesel na França começou em 1992, tendo uma capacidade de produção de 520.000 toneladas por ano, sendo assim o segundo maior produtor de biodiesel da Europa. Contrariamente à Alemanha, o biodiesel na França é vendido como mistura que varia entre 5% a 30% de biodiesel. O biodiesel puro (B100) é essencialmente utilizado nos sistemas de aquecimento como as caldeiras ^[16].

1.3.1.3 Produção de biodiesel na Itália

No caso da Itália o consumo energético tem tido um crescimento praticamente linear ao longo das últimas décadas podendo extrapolar-se com relativa segurança o consumo energético previsto para 2010. Assim, prevê-se que a utilização de energia em 2010 para o sector dos transportes será de 49,1 milhões de toneladas equivalentes de petróleo (TEP). A fim de atingir a meta proposta pela UE, cerca de 2,8 milhões de TEP terão que ser substituídos por biocombustíveis. Actualmente, a Itália utiliza cerca de 80% óleo de colza e 20% óleo de girassol para produzir 3,2 milhões de toneladas de biodiesel (uma vez que o consumo de bioetanol é insignificante) ^[19]. Tal como na Alemanha, a terra que se encontra a pousio não é suficiente para alcançar a meta 5,75%. De facto, dos 30,1 milhões de hectares do território italiano, 27,9 são ocupados por montanhas, florestas, pastagens e terras agrícolas. Os restantes 2,2 milhões de hectares incluem cidades, estradas, e terra não arável. As terras retiradas para pousio foram 0,3 milhões de hectares em 2005 ^[19], assumindo que a Itália tem 0,5 milhões de hectares de terras em pousio já dedicadas aos biocombustíveis, seriam necessárias mais 3,2 milhões de hectares de culturas para atingir a meta de 5,75%. Isto é particularmente preocupante tendo em conta que a Itália é já um importador líquido de quase todas as

categorias de produtos alimentares (carne, cereais, legumes e culturas leguminosas, leite e produtos lácteos, ovos, mel, e outros produtos comestíveis de origem animal), com excepção dos frutos e vinho. Comprida a meta de 2010, tanto os custos de produção de bens alimentares como a exigência da terra arável tornar-se-ia muito mais elevado ^[19].

1.3.1.4 Produção de biodiesel em Portugal

Em Portugal, o governo já deu luz verde à atribuição de isenção de imposto sobre os produtos petrolíferos (ISP) a cinco produtores de biocombustível. Fabricantes como a Biomart, do grupo Martifer, a Torrejana, a Tagol (Nutrinveste), a Biovegetal (grupo SCG) e a Iberol (grupo Nutasa) beneficiaram desta isenção fiscal ^[20]. Comparativamente a outros países europeus, em Portugal, os recursos para a produção das matérias-primas tradicionalmente utilizadas na produção de biodiesel (colza, girassol e soja) são escassos. A produção de biodiesel em Portugal, em 2006 foi de 100 milhões de litros, e estima-se que em 2007 houve uma produção de 230 milhões de litros ^[21]. Segundo António Pontes, administrador da Martifer Energia, Portugal não se perfila como produtor de matéria-prima, conforme sua afirmação: “Ao contrário da Roménia, Portugal não tem vocação para a produção de colza ou outras grandes culturas de regadio, pelo que a matéria-prima que será utilizada é o óleo vegetal, adquirido no mercado internacional”. Na Europa de Leste, o projecto da Martifer inclui para além da fábrica de biodiesel na Roménia ainda uma componente agrícola, que visa fornecer entre 30 a 40% das necessidades de matéria-prima desta unidade romena ^[22]. João Rodrigues, presidente da Iberol afirma que só será importada matéria-prima na medida em que a agricultura nacional não responda em termos de produção: “Por agora, o recurso à importação em substituição da farinha de soja é a única saída. O principal obstáculo à produção de soja no nosso país resulta do sistema de subsídios à agricultura para a produção de oleaginosas, que só contempla aquelas em que a produção de óleo é superior à produção de farinhas ou bagaços, o que não acontece no caso da soja” ^[22].

Para atingir os objectivos estabelecidos pela UE serão necessários mais hectares de terra para a produção agrícola de colza ou outras matérias-primas. A consequência do aumento da utilização de terras para produção de biocombustível poderá ser um importante factor de concorrência entre culturas agrícolas, porque a produção de matérias-primas para a produção de biocombustíveis concorre com outras culturas nomeadamente para fins alimentares.

1.4 *Produção de biodiesel*

O biodiesel correntemente utilizado é um biocombustível essencialmente constituído por uma mistura de ésteres (etílicos, metílicos ou propílicos) de alquilo, produzido por esterificação de ácidos gordos presentes em óleos vegetais ou em gorduras animais, com qualidade para ser utilizado em motores diesel. No entanto a designação “biodiesel” abarca no seu sentido lato todos os biocombustíveis obtidos a partir de óleos vegetais ou gorduras animais que são passíveis de ser utilizados em motores diesel convencionais. Nesse sentido, o “biodiesel” pode ser obtido por vários processos químicos – craqueamento térmico (pirólise), micro-emulsões, esterificação ou transesterificação – a partir de diferentes matérias-primas como sejam os óleos vegetais (soja, algodão, palma, amendoim, colza, girassol, açafoa, coco, etc.), a banha animal ou ainda os óleos alimentares usados. No entanto na prática, o processo mais generalizado é o da transesterificação de óleos vegetais com álcool metílico ou etílico (metanol ou etanol respectivamente), sendo as normas de qualidade estabelecidas em função do biodiesel assim produzido ^[23].

1.4.1 *Pirólise*

A decomposição térmica, ou pirólise, envolve o aquecimento de biomassa a temperaturas entre os 450 e os 850° C na ausência de oxigénio a altas pressões. Neste processo consegue-se provocar a quebra das macromoléculas em moléculas mais pequenas. Contudo, o facto da reacção de pirólise ocorrer ao abrigo do oxigénio diminui os benefícios conseguidos em termos de queima e de emissões poluentes pela utilização de combustíveis oxigenados. Depois da pirólise os hidrocarbonetos obtidos podem ser separados em diferentes categorias equivalente ao gasóleo, gasolina e combustível de aviação. O processo da pirólise é no entanto caro devido aos gastos energéticos associados ^[23].

1.4.2 Pulverização

A pulverização é um processo que permite utilizar a biomassa directamente como “combustível”, reduzindo os custos de produção evitando etapas de transformação intermediárias. A biomassa é reduzida em partículas na ordem dos microns que é adicionada ao combustível fóssil formando uma emulsão aumentando o seu poder calorífico. A combustão de pequenas partículas (pó) juntamente com diesel fóssil, é semelhante à que é realizado por combustíveis líquidos e pode ser realizada em motores convencionais ^[24].

1.4.3 Reacção de transesterificação

A transesterificação (Fig. 4) parece ser a melhor alternativa para a utilização dos óleo vegetais como alternativa ao diesel fóssil. A transesterificação de óleos vegetais é conhecida desde o fim século XVIII e foi largamente empregue para produzir glicerina utilizada no fabrico de sabões ^[25]. O biodiesel obtido por transesterificação é designado no mercado por FAME (do inglês *fatty acid methyl esters*) que corresponde a ésteres metílicos de ácidos gordos ou por FAEE (*fatty acid ethyl esters*), ésteres etílicos de ácidos gordos. Sucintamente, no processo de transesterificação, os triglicerídeos (presentes no óleo ou gordura refinada) reagem com um álcool (metanol) na presença de um catalisador (um ácido ou base forte) dando origem a ésteres metílicos de ácidos gordos e a glicerol (também designado por glicerina) como produto da reacção. No final da reacção forma-se duas fases líquidas imiscíveis, os ésteres metílicos de ácidos gordos na fase superior, e glicerol, metanol e restos de água na fase inferior, sendo as duas fases geralmente separadas por decantação. Posteriormente, a fase que contém ésteres metílicos de ácidos gordos passa por sucessivas etapas de lavagem e purificação, sendo designado biodiesel após a certificação das normas europeias (EN 14214).

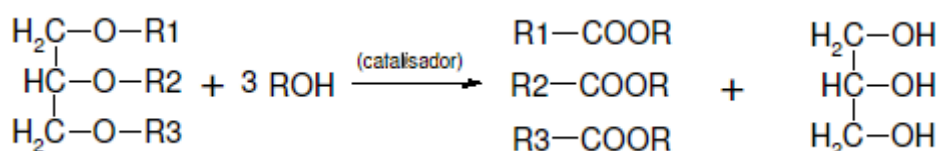


Fig. 4 - Reacção de transesterificação

1.4.3.1 Reagentes da reacção de transesterificação

Como referido anteriormente, os reagentes da reacção de transesterificação são os triglicerídeos contidos nos óleos e o álcool utilizado.

1.4.3.1.1 Glicerídeos

Os glicerídeos são moléculas de glicerol às quais estão ligados um, dois ou três ácidos gordos. Os tipos de ácidos gordos que se ligam ao glicerol são bastante importante visto que são estes que determinam influência as propriedades físicas essenciais do óleo, como a sua viscosidade, o seu ponto de fusão, e que permitem assim prever, à partida o comportamento do biodiesel [26].

1.4.3.1.2 Álcool

É importante referir que apenas os álcoois simples tais como o metanol, etanol, propanol, butanol podem ser utilizados na transesterificação, sendo o etanol e metanol os álcoois mais utilizados [27].

A utilização de metanol na transesterificação é geralmente preferida por razões económicas e por razões relacionadas com o processo. De facto, o metanol é mais barato que o etanol anidro (sem água), e possui apenas um carbono o que lhe confere maior polaridade. Esta última propriedade torna mais fácil a separação entre os ésteres e a glicerina. Contudo, a utilização de etanol pode ser atractiva do ponto de vista ambiental, uma vez que este álcool pode ser produzido a partir de uma fonte renovável (bioetanol), para além de não levantar tantas preocupações relacionadas com a sua toxicidade. No entanto, o processo de transesterificação requer um álcool isento de água, tal como o óleo a ser utilizado como matéria-prima deve apresentar um baixo conteúdo de água, pois caso contrário a separação da glicerina torna-se difícil comprometendo o rendimento [28].

Na reacção de transesterificação, são teoricamente necessárias 3 moles de álcool por cada mole de triglicerídeos. Na prática, é sempre utilizado um excesso de álcool de modo a aumentar o rendimento em ésteres e assim deslocar a reacção que é reversível para o lado dos produtos e facilitar a separação do glicerol formado. A razão molar entre o álcool e o óleo vegetal pode variar de 3:1 até 6:1, contudo, a relação de 6:1 é a mais utilizada apresentando uma boa taxa de conversão quando se utiliza um catalizador alcalino ^[29] ^[30].

1.4.3.2 Produtos da reacção

A transformação dos reagentes nas reacções químicas origina os denominados produtos da reacção. Na reacção de transesterificação, os produtos são ésteres metílicos de ácidos gordos e glicerina (utilizando metanol).

1.4.3.2.1 Biodiesel ou éster de alquilo

Quimicamente, o biodiesel é uma mistura simples, uma vez que contém não mais do que seis ou sete ésteres de ácidos gordos. O número de cetano (CN), a densidade, a viscosidade, o ponto de fusão, as características de fluxo a frio, o poder calorífico e o grau de saturação são algumas das principais propriedades do biodiesel que variam bastante com o tipo de ácido gordo esterificado. A composição química e as propriedades do biodiesel dependem da constituição, dos ácidos gordos que lhe deram origem, nomeadamente do comprimento e do grau de saturação destes mas também em certa medida dos álcoois utilizados no seu fabrico ^[31].

1.4.3.2.2 Glicerina

O glicerol (1,2,3-propanotriol ou ainda glicerina) pode ser encontrado em todas as gorduras e óleos e é um intermediário importante no metabolismo dos seres vivos. O termo glicerol aplica-se geralmente ao composto puro, ou seja ao 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se usualmente aos produtos comerciais que contenham 95% ou menos de glicerol na sua composição. A glicerina pode ser vendida na sua forma bruta (glicerina natural), sem qualquer purificação, ou purificada. São comercializados dois tipos de glicerina

natural. O primeiro impõe uma especificação de pelo menos 80% de glicerol, enquanto o segundo impõe como especificação 88 a 91% de glicerol. Quanto à glicerina purificada é classificada em glicerina técnica (99,5% de glicerol) ou glicerina farmacêutica (86% ou 99,5% de glicerol) ^[32].

A glicerina apresenta uma grande quantidade de aplicações. O facto de não ser tóxica, de ser incolor e inodora são propriedades apreciadas pela indústria. Assim, a glicerina é importante na indústria farmacêutica e cosmética, podendo ser utilizada como amaciador, emoliente para a pele, ou ainda, graças à sua alta viscosidade utilizada em xaropes ^[33].

1.4.3.3 Catalizadores

Os catalizadores são utilizados para aumentar a velocidade da reacção química, mas não participam da formação de produtos sendo completamente regenerados no final. Na reacção de transesterificação pode-se falar em processos de catálise ácida, catálise básica ou ainda catálise enzimática. No entanto existem processos que devido às condições físicas em que decorrem não necessitam de catalisador, como é o caso da utilização do metanol supercrítico.

1.4.3.3.1 Metanol supercrítico

A transesterificação do óleo de colza com metanol supercrítico é um processo muito eficiente. De facto, é possível alcançar uma conversão superior a 95% em apenas 4 minutos. No entanto, são necessárias temperaturas e pressões elevadas (350° C e 30 MPa) e uma razão molar metanol/óleo de 42:1, o que restringe actualmente esta tecnologia ao laboratório ^[34].

1.4.3.3.2 *Catalizadores enzimáticos*

A transesterificação pode ser realizada utilizando catalizadores enzimáticos que não são mais do que enzimas biológicas denominadas lipases. O processo é ainda experimental não sendo aplicado a nível industrial. Os tempos e os rendimentos atingidos por este processo, tornam o processo pouco atractivo quando comparável com a catálise básica ^[28], no entanto o preço da enzima e a sua estabilidade ao longo do tempo inviabilizam actualmente essa tecnologia ^[35].

1.4.3.3.3 *Catálise ácida*

Nos processos de catálise ácida a transesterificação é catalisada por um ácido, preferencialmente o ácido sulfónico ou sulfúrico por serem mais fáceis de obter anidros. O rendimento obtido é muito elevado (99%), mas a reacção é lenta podendo demorar mais de um dia ^[36]. As principais vantagens da transesterificação em meio ácido são a ausência de formação de sabões, e a conversão de ácidos gordos livres (que o óleo eventualmente contenha) em biodiesel. No entanto, a reacção de transesterificação em meio ácido é aproximadamente seis vezes mais lento do que a transesterificação básica, o que faz com que este método seja menos utilizado ^[29].

1.4.3.3.4 *Catálise básica*

O processo de produção de biodiesel por catálise básica é o processo de transesterificação mais comum. Este método é rápido e utiliza catalisadores alcalinos tido como menos corrosivos que os ácidos, razões pelas quais é a metodologia preferida por parte da indústria. Como catalisadores podem ser utilizados alcóxidos (como o metóxido ou etóxido de sódio e potássio), hidróxidos de sódio e potássio, ou ainda carbonatos de sódio e potássio ^[36].

1.5 Lavagem e purificação do biodiesel

A reacção de transesterificação, dificilmente consegue ser completa e por isso os produtos da reacção pretendidos (os ésteres) encontram-se sempre os catalizadores em certa medida com os reagentes. Por esta razão, após a transesterificação é necessário a existência de um andar de lavagem e purificação por processos químicos e físicos para purificação do produto. A separação do glicerol e do biodiesel é normalmente realizada por decantação, já que o biodiesel e a glicerina à temperatura ambiente são imiscíveis. Posteriormente à decantação, o biodiesel é sujeito a várias lavagens com água para remover os resíduos, restos de sabões, catalisador e álcool que ainda esteja presente no biodiesel. Outra solução possível em alternativa às lavagens é a utilização de silicato de magnésio, também conhecido pelo nome comercial de Magnesol^[37]. O silicato de magnésio tem a capacidade de purificar o biodiesel absorvendo os contaminantes nele existentes, permitindo assim obter um biodiesel limpo sem recorrer.

Após a lavagem é feito um polimento final do biodiesel, essencial para garantir que o combustível, uma vez lavado, esteja livre de contaminantes sólidos. O processo de filtração do combustível produzido pode ser realizado através de um filtro *by-pass*^[38].

1.6 Matérias-primas

Os óleos mais utilizados como matéria-prima no fabrico de biodiesel são os óleos de soja palma na América do Sul e os óleos soja e colza na Europa, embora também se utilizem girassol mamona e dendê como matérias-primas. Culturas oleaginosas têm vindo a ser estudadas na Índia, como por exemplo a *Jatropha* e *Pongamia pinnata* ^[41].

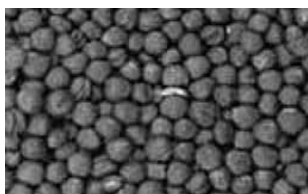


Fig. 5 - Sementes de colza.



Fig. 6 - Sementes de soja.



Fig. 7 - Sementes de palma.



Fig. 8 - Girassol.



Fig. 9 - Sementes de mamona.



Fig. 10 - Sementes de dendê.

As gorduras naturais existentes contêm cerca de 95% de triglicerídeos, isto é, tri-ésteres de glicerol com ácidos gordos entre 0,1 e 2% de diglicerídeos de monoglicerídeos ^[26].

Os ácidos gordos que formam os triglicerídeos, são predominantemente de número par, e de cadeia linear. Quimicamente os ácidos gordos são ácidos monocarboxílicos alifáticos com cadeias que vão desde os 4 até aos 24 átomos de carbono ($C_4 - C_{24}$). Os ácidos gordos podem ser classificados como saturados e insaturados. Os primeiros ácidos gordos não têm qualquer ligação dupla enquanto os segundos podem ter uma, ou mais ligações duplas. Assim, os ácidos gordos insaturados variam no número de ligações duplas, na sua posição e na configuração dos ácidos gordos ^[42]. A presença de muitas ligações duplas são desfavoráveis para a produção de biodiesel, pois conduzem à formação de depósitos no motor, assim como lhe conferem uma baixa volatilidade e alta viscosidade o que a conduz a problemas na atomização do combustível. A composição de um ácido gordo costuma ser apresentado por exemplo: C18:1, significando que contém 18 átomos de carbono e uma ligação dupla na estrutura. Para além dos ácidos gordos ligados às moléculas de glicerol, existem ácidos gordos que não se encontram ligados, sendo designados por ácidos gordos livres. Estes podem representar entre

0,3 a 2,0% da composição dos óleos vegetais virgens, ou mesmo mais quando se fala de óleos alimentares usados. Os ácidos gordos livres são responsáveis pela acidez dos óleos e gorduras [26] [42].

A crescente procura de biocombustíveis tem vindo a exigir quantidades cada vez maiores de matéria-prima. Os efeitos mais evidentes são a subida dos preços dos produtos agrícolas e a expansão da superfície cultivada com consequente desflorestação e destruição da biodiversidade. De facto, todos os biocombustíveis consomem produtos agrícolas que poderiam servir para alimentar um planeta faminto ^[43]. Segundo as conclusões de um relatório da ONU, embora proporcionando potenciais vantagens, o crescimento explosivo dos biocombustíveis poderá enfraquecer a segurança alimentar e aumentar os preços dos alimentos num mundo onde 25 mil pessoas morrem de fome todos os dias, na sua maioria crianças com menos de 5 anos de idade ^[17]. A única forma de colher os benefícios dos biocombustíveis sem diminuir o abastecimento de bens alimentares consiste em produzir biocombustíveis que não interfiram com culturas alimentares ^[17]. A dificuldade consiste em descobrir a forma de produzir biocombustível a partir de plantas que não sejam utilizadas para consumo alimentar.

Os actuais preços do biodiesel permitem apenas uma competitividade marginal deste combustível face ao diesel mineral. É portanto fundamental descobrir novas fontes de óleos baratas passíveis de serem utilizados no fabrico de biodiesel. Existem várias culturas oleaginosas com potencial para matérias-primas para biodiesel. Há óleos vegetais sem aplicação alimentar, ou cosmética que podem ser viáveis para a produção de biodiesel, uma vez que são matérias-primas menos exploradas e de custo potencialmente reduzido. Têm sido testadas diferentes culturas oleaginosas de forma a determinar que quantidade de óleo seria possível extrair das mesmas. Uma solução será desenvolver projectos de produção de matéria-prima integradas na produção de biodiesel, permitindo assim promover o desenvolvimento sustentado da agricultura e indústria do país, reduzindo assim a dependência energética da nossa economia do petróleo e favorecendo o crescimento económico.

Com o aumento da produção de matérias-primas que se verifica de ano para ano, teme-se que os preços dos óleos atinjam valores exorbitantes. Na Fig. 11 ^[44] estão representados os aumentos de preços de alguns óleos utilizáveis na produção de biodiesel.

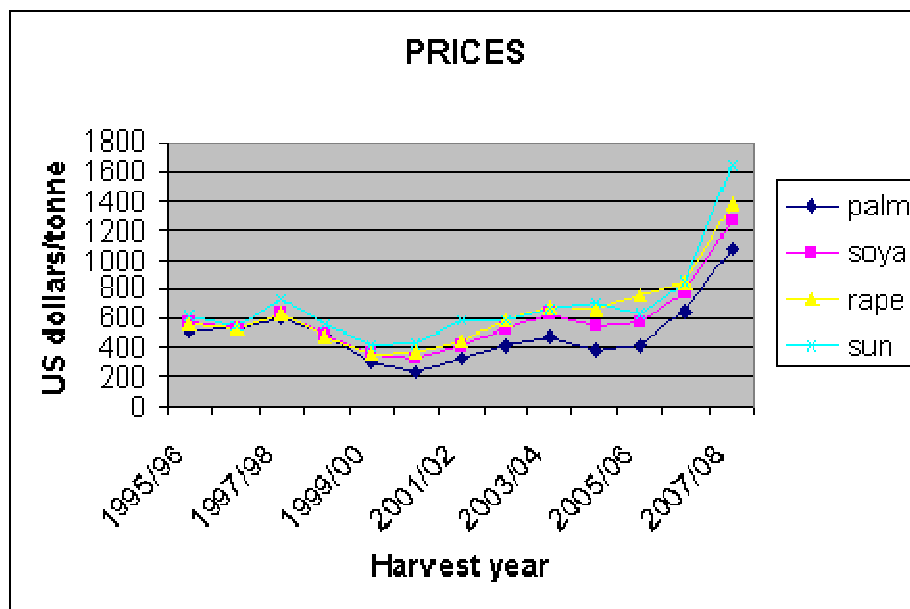


Fig. 11 - Evolução do preço de palma, soja, colza e girassol.

Outras culturas têm vindo a ser estudadas com o objectivo de produzir biodiesel. Os principais critérios para análise e selecção de matérias-primas para a produção de biodiesel são os seguintes:^[41]

- Grande teor de óleo por área e por período de cultivo.
- A cultura deve apresentar um balanço energético favorável.
- O preço da matéria-prima deve ser suficientemente baixo para de fornecer biodiesel a preços equivalentes ao diesel.
- Os subprodutos de extracção deve ser aproveitados sempre que possível.
- A cultura das oleaginosas deve ser parte da rotação de culturas regionais.
- O biodiesel produzido deve atender as especificações dos motores.

1.7 *Microalgas*

Embora não seja conhecida nenhuma cultura capaz de resolver totalmente os problemas energéticos sem prejudicar o ambiente, a cultura das microalgas são as que mais se aproximam desse objectivo uma vez que podem crescer em águas residuais, até mesmo em água do mar necessitando pouco mais de dióxido de carbono e luz solar para se desenvolverem. As microalgas são organismos fotossintéticos aquáticos dimensões microscópicas sendo muitas delas unicelulares. A actual cultura de microalgas em massa tem como objectivo diversas aplicações, desde a produção de produtos para a indústria farmacêutica, indústria alimentar, para agricultura e aquacultura. Devido ao elevado teor lipídico de algumas espécies, às consideráveis taxas de crescimento, e à produtividade por área, as microalgas são hoje alvo de intensa investigação tendo em vista a produção de energia. No entanto, actualmente os custos associados à produção de óleo de microalgas, tornam ainda o processo difícil. As algas armazenam energia sob a forma de lípidos, que apresentam características físico-químicas similares aos dos óleos vegetais, podendo ser consideradas como potenciais matérias-primas para a produção de biodiesel. A utilização de microalgas para a produção de biodiesel apresenta as seguintes vantagens relativamente as culturas oleaginosas convencionais: ^[41].

- Quando cultivadas, as microalgas têm reduzidos custos de colheita e transporte.
- As microalgas necessitam de um menor consumo de água, podendo esta ser salina.
- As microalgas não necessitam de condições climáticas exigentes.
- Comparativamente às colheitas convencionais, as microalgas apresentam elevadas eficiências fotossintéticas sendo eficientes fixadores de CO₂.
- Em condições ideais, as microalgas conseguem duplicar a sua massa em poucas horas.
- Um hectare de microalgas pode potencialmente produzir 45 mil litros de biocombustível por ano enquanto que um hectare de soja produz 560 litros de biodiesel por ano.
- O rendimento das microalgas é pelo menos 15 vezes maior que a palma ^[43].
- O milho e a soja dão uma colheita por ano, as algas podem ser recolhidas diariamente ^[45].

Apesar dos inúmeros projectos existentes no mundo para a produção de biodiesel a partir das algas, nenhum produz actualmente à escala industrial. Segundo Marcus Gay director da GeenFuel, sociedade GeenFuel Technologies empresa norte americana que tem investido na produção de biocombustíveis a partir de algas, o problema reside no conhecimento técnico: “existe uma boa razão para haver talvez uma dúzia de pessoas no planeta que sabe cultivar algas em sistemas de alta densidade” ^[45]. Se metade das necessidades do consumo de combustível nos EUA fosse substituído por biodiesel produzido por culturas convencionais era necessária uma insustentável área de cultivo de culturas oleaginosas. Claramente as culturas oleaginosas não podem substituir na totalidade o consumo de combustível fóssil. No entanto, este cenário poderia mudar claramente se considerarmos a utilização de microalgas, onde seria necessário apenas 1 a 3% da área total de cultivo dos EUA para satisfazer 50% das necessidades desse país. A Tabela 2 ^[46] evidencia o rendimento das várias matérias-primas.

Tabela 2 - Comparação das várias matérias-primas para produção de biodiesel.

Matéria-prima	Rendimento do óleo (L/ha)	Área necessária¹ (M ha)	Percentagem de área de cultivo (%)
Milho	172	1540	846
Soja	446	594	326
Colza	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Coco	2689	99	54
Óleo de Palma	5950	45	24
Microalga²	136.900	2	1,1
Microalga³	58.700	4,5	2,5

¹Área necessária para produzir 50% das necessidades dos EUA.

²Biomassa com 70% de óleo.

³Biomassa com 70% de óleo.

Devido à elevada taxa de crescimento das microalgas, estas parecem ser a única fonte para produção de biodiesel capaz de substituir completamente o diesel fóssil. O óleo retirado das microalgas pode atingir 75% do peso seco da biomassa, no entanto o mais usual é atingir valores de 20 a 30 % ^[46]. Apesar da grande diversidade das microalgas, apenas algumas

dezenas de espécies são exploradas para produção de biodiesel. Na Tabela 3 encontram-se representadas algumas espécies de microalgas que apresentam grande potencialidade para produção desse biocombustível.

Tabela 3 - Percentagem de óleo de algumas espécies de microalgas

Microalga	Percentagem de óleo (%)
<i>Botryococcus braunili</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-32
<i>Dunaliella primolecteca</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum sp.</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

As microalga têm potencial para poder substituir o diesel fóssil, no entanto, a sua produção é ainda dispendiosa. O crescimento destes organismos fotossintéticos exige luz, dióxido de carbono, água, sais orgânicos e temperaturas reguladas entre 20 a 30°C, ou seja, para maximizar a produção é necessário um processo de crescimento controlado. O custo do processo de produção de microalgas é ainda elevado considerando a produção de um combustível, estando relacionado com questões biológicas e questões técnicas de engenharia. Para minimizar estes custos, as culturas de algas devem utilizar a luz solar. No entanto, o uso da iluminação natural fazem com que no período noturno, as microalgas possam a perder durante a noite cerca de 25% da sua biomassa ^[46].

A utilização de microalgas apresenta grande potencialidade para a produção de biodiesel e é tecnicamente atingível. Contudo, para que este processo seja competitivo com o diesel fóssil, é necessário seleccionar algas com alto teor de lípidos e fornecem as condições de cultura adequadas de forma a maximizá-lo. Em paralelo, é estritamente necessário desenvolver novos conceitos de Engenharia para diminuir os custos de produção.

1.7.1.1 Características das microalgas

Embora existam diferenças na composição das várias microalgas as proteínas são os principais constituintes, geralmente seguidos por lípidos e hidratos de carbono. A maioria das microalgas cultivadas comercialmente tem entre 12-35% de proteínas, 7,2-23% de lípidos e 4,6-13% de hidratos de carbono relativamente ao peso seco. As espécies de microalgas do género *Chlorella*, são muito utilizadas para a produção de biomassa. Essas espécies podem ser cultivadas em diferentes meios de cultura, apresentando uma boa produção de biomassa com um teor de lípidico aceitável (*Chlorella* sp apresenta tipicamente um teor de lípidos que varia entre 18-31% do seu peso seco). O teor lipídico das microalgas depende de vários factores, como por exemplo das condições de cultura, podendo a mesma espécie apresentar percentagens de lípidos diferentes em função por exemplo da composição química do meio de cultura^{[47] [48]}. O género *Chlorella* sp. parece conter um maior teor de ácidos gordos de cadeia curta e saturados e mono-insaturados do que em outros géneros de algas verdes (14:0, 16:0, 16:1, 18:0 e 18:1).^{[49] [50]}.

1.8 Processos de extracção

Considere-se extracção de lípidos a metodologia empregue com vista a remoção e recuperação dos lípidos do interior das células. No caso das microalgas, o processo de extracção do óleo é uma etapa dispendiosa que dita a viabilidade económica deste biodiesel face ao diesel fóssil. Neste trabalho, o objectivo é extrair essencialmente óleo com características adequadas para a produção de biodiesel. Os vários métodos de extracção existentes são os seguintes;

- Prensagem mecânica
- Extracção por solventes orgânicos
- Extracção por CO₂ supercrítico
- Extracção por ultra-sons

1.8.1 Prensagem mecânica

Depois de realizado o processo de secagem das algas, o óleo é retirado por prensagem. Este método é mecânico e sujeita as células a uma elevada pressão que tem como objectivo “rebentar” as células para ser retirado o óleo. Não se trata de um processo muito eficiente com rendimento de apenas 70 a 75% ^[51]. No entanto, trata-se de um processo económico e que permite valorizar os resíduos. As prensas usadas para este fim são normalmente constituídas por um parafuso sem fim. A titular de exemplo, a prensa apresentada na Fig. 12 ^[52], apresenta uma capacidade de esmagamento de 350Kg/h, um motor eléctrico de 35KW e um rendimento de 36-42%.



Fig. 12 - Prensa mecânica

1.8.2 Extracção por solventes orgânicos

A extracção do óleo através de solventes orgânicos consiste na solubilização do óleo presente na biomassa em solventes orgânicos com posterior separação de biomassa por decantação e/ou filtração. A solubilidade, é a medida da capacidade de uma determinada substância (líquido ou sólido) de se dissolver num líquido. Quando se trata de solubilidade, o carácter de polaridade das substâncias influi muito, ou seja, devido à polaridade das substâncias, estas serão mais ou menos solúveis ^{[53] [54]}.

Quanto à polaridade de uma substância, ela pode ser polar ou apolar. Dois átomos unidos por uma ligação covalente compartilham electrões entre si, deste modo os núcleos desses átomos encontram-se ligados pela mesma nuvem electrónica. Na maioria dos casos, porém, os dois núcleos não compartilham igualmente os electrões, a nuvem electrónica é mais na vizinhança de um átomo que na do outro. Por essa razão, uma das extremidades da ligação apresenta-se electricamente mais negativa e outra positiva, e a outra criando assim um dipolo. Diz-se que uma ligação nestas condições possui polaridade, ou seja, é uma ligação polar. É de esperar que uma ligação possua polaridade quando dois átomos apresentem diferentes tendências para atrair electrões, ou seja átomos com diferentes electronegatividades. A polaridade das moléculas é definida pela polaridade das suas ligações e influencia os pontos de fusão, de ebulição e a sua solubilidade noutras substâncias ^[55].

O principal foco de extracção são os triglicerídeos, isto é, lípidos com características apolares ou neutrais. No passado, na extracção de óleos empregava-se benzeno e éteres, no entanto devido à toxicidade destes solventes e ao seu custo foram gradualmente abandonados em favor do hexano (n-hexano) principalmente devido ao seu baixo custo e menor toxicidade. A utilização de solventes orgânicos apresenta riscos, muitos dos solventes empregues são potencialmente cancerígenos (como por exemplo o benzeno), e têm baixos pontos de inflamação o que lhe confere um elevado risco de explosão. A utilização de solventes pode ser utilizada por si só ou em associação com prensagem mecânica. Neste último caso, a polpa resultante da prensagem é misturada com o solvente de forma a solubilizar o restante óleo, sendo posteriormente filtrada e separado do óleo por destilação. Com esses dois passos (prensagem e solvente) será possível remover cerca de 95% do óleo total presente nas microalgas ^[57]. A utilização de solventes orgânicos pode inviabilizar a utilização dos resíduos

da extracção, a alimentação animal, uma vez que podem permanecer vestígios dos solventes orgânicos utilizados.

1.8.2.1 Solventes orgânicos utilizados

No campo da extracção dos óleos, existem vários tipos de solventes utilizáveis em função da finalidade do produto em causa. De seguida apresentamos os solventes com mais interesse para a produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas, por ordem crescente da sua polaridade: n-hexano; clorofórmio, etanol, metanol ^[58].

1.8.2.1.1 n- Hexano

n-Hexano é um hidrocarboneto alcano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) com peso molecular 86,17 g/mol e uma densidade de 0,66 g/cm³. Nas moléculas dos alcanos, os átomos são mantidos em posição, graças às ligações covalentes estabelecidas entre eles. Estas ligações, ou existem entre dois átomos da mesma espécie e são ligações apolares, ou existem em dois átomos que diferem pouco em electronegatividade e são por isso ligeiramente polares. O n-hexano, é uma molécula ligeiramente polar. O n-hexano é um trata-se de um componente comum da gasolina, no entanto, é frequentemente utilizado como solvente inerte em reacções químicas. Apresenta riscos de inflamação e é nocivo para a saúde humana provocando numa primeira fase dores de cabeça tonturas e náuseas ^{[53] [54] [55] [56]}.

1.8.2.1.2 Clorofórmio

O clorofórmio (CHCl_3) é uma molécula com peso molecular de 119,38 g/mol e uma elevada densidade (1,48g/cm³) sendo usado como refrigerante nos aparelhos de ar-condicionado domésticos ou nos frigoríficos de grande capacidade, sendo actualmente mais utilizado como solvente. O clorofórmio apresenta polaridade intermédia, o que lhe permite dissolver solutos polares e apolares. O clorofórmio pode causar irritação à pele, olhos e aparelho respiratório, podendo mesmo ser fatal em caso de inalação prolongada. Este solvente afecta o sistema nervoso central, os rins, o sistema cardiovascular e o fígado, podendo causar cancro dependendo do nível e duração de exposição ^{[53] [54] [55]}.

1.8.2.1.3 Etanol e metanol

Os álcoois podem desempenhar uma grande variedade de papéis, podem ser utilizados como bases, sendo amplamente empregues como solventes na indústria. Os álcoois são compostos da fórmula geral R-OH, em que R apresenta qualquer grupo alquilo, e o grupo funcional OH é o “responsável” primário pelas características e propriedades do álcool. Um álcool assemelha-se a um alcano devido as características do seu grupo alquilo, mas também é semelhante ao grupo hidroxilo da água. O grupo hidroxilo é altamente polar, no entanto, à medida que o grupo alquilo vai aumentando, a molécula adquira cada vez mais propriedades apolares no seu todo, ou seja, torna-se mais lipofílica.

O etanol ou álcool etílico (C_2H_5OH ou C_2H_6O) corresponde ao álcool comum, tendo um peso molecular de 46,07 g/mol e densidade de 0,789 g/cm³. O etanol é muito menos tóxico do que o metanol, e exibe um ponto de inflamabilidade superior ao metanol. O etanol emprega-se extensamente na indústria como solvente, na preparação de tintas, vernizes, perfumes e essências, serve também de meio para onde se produzem reacções químicas e recristalizações.

O metanol ou álcool metílico (CH_3OH), tem um peso molecular de 32,04 g/mol e uma densidade de 0.792 g/cm³ sendo um álcool mais tóxico que o etanol. O metanol é utilizado principalmente como um solvente industrial, sendo melhor solvente de alguns sais que o etanol. O metanol é ainda utilizado na indústria de plásticos, na extracção de lípidos e pigmentos e como solvente em reacções de importância farmacológica [53] [54] [55] [56].

1.8.2.2 Métodos de extracção através de solventes orgânicos

Existem vários métodos de extracção de lípidos através da aplicação de solventes orgânicos que se diferenciam entre si devido às diferentes combinações de solventes. A utilização de diferentes combinações têm como objectivo aumentar a eficiência da extracção e/ou extrair tipos particulares de lípidos. Normalmente estes processos foram desenvolvidos em laboratório e destinam-se a aplicações em pequenas amostras. Os métodos de extracção apresentam etapas em comum, como a extracção propriamente dita, a filtração e a destilação. A etapa inicial da extracção, consiste na homogeneização da mistura de solventes com a matéria-prima por contacto. Os resíduos sólidos são de seguida separados por filtração

auxiliada por vácuo num funil de tipo Buchner de poro reduzido. O óleo é recuperado através da destilação do solvente.

1.8.2.2.1 *Método de Bligh & Dyer*

Um dos métodos mais referenciados na bibliografia é o método de Bligh & Dyer. É um processo clássico muito empregue à escala laboratorial que utiliza uma mistura de clorofórmio, metanol e água nas proporções 1:2:0,8 (v/v) para. Inicialmente, adiciona-se uma mistura de clorofórmio com metanol à amostra de biomassa de que se quer extrair o óleo. A utilização do álcool, para além de permitir a extracção de facilita actuação do clorofórmio. A adição da água, tem como objectivo “remover” o álcool da mistura uma vez que são miscíveis, perfazendo assim duas fases, uma superior constituída por álcool e água, e um inferior formada por clorofórmio, óleo e resíduos da biomassa. As duas fases são separadas por decantação, seguindo-se se necessário uma filtração, sendo o óleo obtido por destilação do solvente ^{[59] [60]}.

1.8.2.2.2 *Método de Folch*

O método de Folch é uma versão modificada do método de Bligh & Dyer, embora utilize os mesmos solventes emprega volumes menores e diferentes proporções. Este método apresenta uma relação de clorofórmio, metanol e água de 8:4:3 (v:v) para uma relação de 20:1 de solvente em relação à amostra ^{[61] [62] [63]}.

1.8.2.2.3 *Método Hara & Radin*

O método de Hara & Radin foi sugerido como substituição ao método de Bligh & Dyer. É um método que apresenta menor toxicidade, uma vez que substitui o clorofórmio/metanol por uma mistura de n-hexano e isopropanol 3:2 (v/v). Apresenta baixa eficiência de extracção total de lípidos, mas é um método muito selectivo para lípidos neutros, ou seja, os lípidos mais interessantes para a produção de combustível ^[58].

1.8.3 Extracção por CO₂ supercrítico

Este método consegue teoricamente quase 100% do conteúdo total em óleo de algumas sementes, no entanto esta técnica requer equipamento especial. Neste processo, o CO₂ é liquefeito sobre pressão e aquecido até ao ponto onde têm simultaneamente propriedades de líquido e de gás. Esse fluído actua como um solvente solubilizando o óleo. Os valores de pressão e temperatura podem variar entre várias gamas, sendo usual trabalhar a partir de 220 bar e uma temperatura a partir dos 55 °C. Este método requer material seco e previamente moído (as células têm que estar rebentadas) de modo a aumentar a eficiência. No caso das microalgas o seu uso restringe-se à produção de compostos mais delicados como ácidos gordos essenciais, anti-oxidantes ou pigmentos ^{[64] [65]}.

1.8.4 Extracção por ultra-sons

Este método é raramente utilizado isoladamente, no entanto, associado à extracção por solvente orgânico, permite acelerar sensivelmente o processo. Os ultra-sons são ondas de pressão de alta-frequência que criam bolhas de cavitação, que ao colapsarem, danificam as células promovendo a libertação do seu conteúdo e para o meio envolvente ^[58].

Esta técnica baseia-se na emissão de ondas mecânicas (sons) que se propagam a elevada frequência (muito acima da gama audível, de onde deriva a designação de ultra-sons). Quando líquidos são submetidos às ondas ultra-sónicas de alta potência estas produzem sucessivas ondas de compressão e depressão no meio, no qual, dependendo da viscosidade, pode ocorrer o surgimento de cavidades de dimensões microscópicas durante uma fase de depressão. A ocorrência de gases e vapores no meio irradiado faz com que moléculas dos gases e vapores migrem para o interior das cavidades. Nos sucessivos ciclos de compressão e depressão as dimensões da cavidade vão aumentando até que se atinge o diâmetro crítico levando finalmente ao colapso, a este processo denomina-se cavitação acústica. O colapso das bolhas transientes provoca a libertação de grande quantidade de energia gerando temperaturas e pressões locais instantâneas muito elevadas provocando o rebentamento das células.

1.9 *Síntese*

Ao longo deste capítulo, foram abordados vários assuntos da produção de biodiesel, desde os tipos de matéria-prima utilizáveis aos processos de extracção do óleo e ainda reacções químicas que originam o biodiesel. Para além do custo de produção da biomassa, que servirá de matéria-prima, a extracção dos óleos é uma das etapas cujo custo associado, define a viabilidade económica da produção de biodiesel. Factores como o rendimento, balanços energéticos e tempo de extracção, são indicadores que permitem avaliar a eficiência do processo. Devido à sua complexidade e custo, a extracção dos lípidos tem vindo a merecer a atenção de muitos estudos realizados nesta área.

A nível industrial, o processo da extracção de lípidos para biodiesel segue essencialmente duas vias: extracção exclusivamente mecânica (por prensagem) e extracção mecânica juntamente com a utilização de solventes orgânicos. A extracção mecânica é um procedimento relativamente simples onde o óleo é obtido por esmagamento das células, através da utilização de uma prensa mecânica, embora com rendimentos inferiores. A extracção mecânica seguida extracção por solventes orgânicos permite rendimentos superiores. Neste ponto, a selecção do solvente a utilizar influencia todo o processo a jusante. A utilização de um álcool (metanol, etanol ou outro) pode apresentar grandes vantagens em termos de simplicidade do processo e custos energéticos. Apesar de não serem solventes tão bons, não necessitam de ser removido após o processo de extracção, permitindo seguir o processo produtivo sem destilações para recuperação de óleo e solvente. Desta forma é possível passar directamente para a reacção de transesterificação sem etapas intermediárias. A utilização de metanol não permitirá o aproveitamento da massa residual para a criação de alimentação para animais, no entanto não impede a sua utilização como fertilizantes agrícolas. A utilização de etanol no processo de extracção viabiliza a utilização do resíduo da extracção para alimentação animal, todavia o etanol é geralmente mais caro que o metanol. Portanto, a utilização do metanol ou do etanol deriva simplesmente de factores económicos do processo envolvido, uma vez que os rendimentos de extracção deverão ser teoricamente próximos devido à semelhança das suas propriedades físico-químicas.

Os outros solventes descritos (hexano e clorofórmio) apresentarão rendimentos superiores na extracção dada a sua maior hidrofobicidade, no entanto, têm como desvantagens o gasto energético necessário para a sua destilação e os riscos que se lhe encontram inerentes. Outra desvantagem do uso desses solventes é a potencial contaminação dos resíduos sólidos, apresentando assim menos alternativas à valorização no mercado dos mesmos .

Ficou patente neste primeiro capítulo, que existem várias possibilidades de se realizar a extracção de lípidos a partir das microalgas. Para se encontrar o processo que seja em simultâneo economicamente viável e simples em termos de engenharia é necessária uma análise minuciosa dos rendimentos obtidos com os vários solventes, os riscos inerentes à sua utilização, os respectivos balanços energéticos e custos económicos. Só assim se consegue obter respostas esclarecedoras acerca da viabilidade da produção de biodiesel a partir de microalgas.

Capítulo II

No capítulo II, é apresentado todo o procedimento experimental, desde a cultura das microalgas até à extracção do respectivo óleo. A primeira parte deste capítulo consiste na cultura de microalgas em laboratório e a respectiva cultura “em massa”. Na segunda parte, após separação da biomassa do restante meio e realizada a respectiva secagem, efectua-se o processamento do material seco estudando vários processos de extracção utilizando diferentes solventes orgânicos.

2 Reagentes utilizados

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos às empresas Sigma-Aldrich e Vaz Pereira, sendo de grau analítico, os utilizados na cultura de laboratório e nas extracções. Os reagentes empregues na cultura de microalgas “em massa” têm níveis de pureza mínimo de 95% e são classificados de técnicos. Uma vez que estes ensaios se destinam a testar uma solução industrial de produção de biomassa optou-se por utilizar reagentes de qualidades semelhantes aos que tencionamos utilizar a nível no futuro.

2.1 Espécie cultivada

A selecção da espécie de microalga a cultivar depende essencialmente da finalidade a que se destina, assim como dos requisitos da sua cultura. Sendo a microalga seleccionada para fins de combustível, a espécie deve conter um elevado poder calorífico, baseado sobretudo no seu teor lipídico e uma boa taxa de crescimento. No entanto, há espécies que embora apresentem um teor de lípidos mais elevado a qualidade dos seus lípidos não é favorável para a produção de biodiesel. A espécie seleccionada foi a *Chlorella vulgaris* Beijernick (1890), adquirida à *Culture Collection of Algae Protozoa SAMS Research Services* da Escócia. É uma espécie que apresenta uma boa taxa de crescimento, susceptível de ser manipulada em termos de condições de cultura para aumentar o teor em lípidos. O género *Chlorella* encontra-se bem caracterizado e apresenta um bom teor de óleos saturados que são os mais adequados para a produção de biodiesel.

Embora exista no mercado algumas empresas que comercializam microalga *Chlorella* em pó (por exemplo a alemã *Bioprodukte Prof. Steinberg, Produktions- und Vertriebs GmbH & Co. KG*), tomou-se a opção de não adquirir as mesmas. Embora o objectivo deste trabalho não seja otimizar condições de cultura, a compra da microalga, não permite ter qualquer controlo sobre as condições de cultura, espécie e variedade de microalga, para além de nos permitir adquirir conhecimento sobre a cultura de microalgas para aplicação futuras.

2.1.1 Cultura das microalgas em laboratório

A microalgas *Chlorella vulgaris* foi cultivada em duas fases. Uma primeira fase (a que foi chamada cultura “em laboratório”) consiste na manutenção da espécie em laboratório e da preparação de aproximadamente 4,5L de cultura da microalga para usar como inóculo para a segunda fase de produção. Essa fase procede-se a cultura dita “em massa” do maior volume possível. A cultura das microalgas foi realizada de forma semelhante semanalmente. O método de cultura processado em laboratório encontra-se ilustrado na Fig. 13.

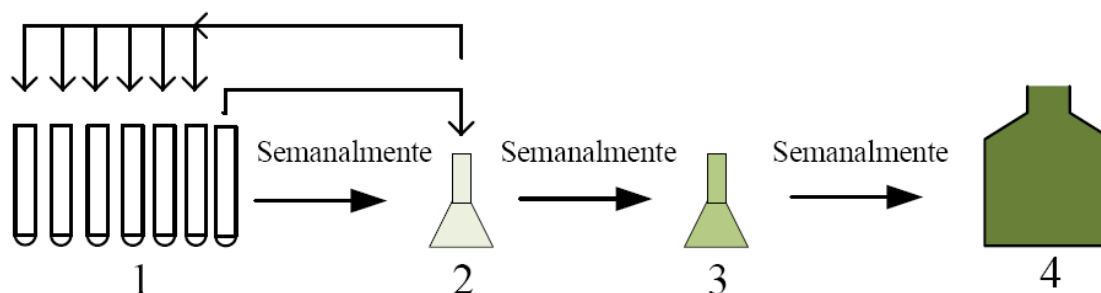


Fig. 13 - Representação do processo de cultura em laboratório.

Partindo de uma amostra inicial de microalgas (~10ml), iniciou-se o processo de cultura num pequeno balão erlenmeyer de 100ml com 50ml de meio de cultura, permanecendo numa câmara de cultura iluminada e termostatizada (Forma Scientific, Modelo 3744) durante uma semana. Posteriormente a cultura foi transferida para um balão erlenmeyer de 250ml com 100ml de cultura, prosseguindo o processo de cultura durante mais uma semana. Ocasionalmente, são retiradas amostras desse primeiro erlenmeyer que são utilizados para

inocular tubos de cultura com cerca de 10 ml. Esses servirão como base para as inoculações de erlenmeyers das semanas seguintes. As culturas são diariamente agitadas.

Após a segunda semana a cultura deste segundo erlenmeyer é utilizada para inocular um garrafão de 5 litros com 4,5 litros de cultura. Esse garrafão é constantemente agitado pela injeção de ar realizada por uma pequena bomba de ar comprimido (Oxyboost APR 300), permitindo uniformizar a iluminação das células e facilitando as trocas com o meio, para além de equilibrar as pressões relativas de CO₂ e O₂ para os níveis atmosféricos. O garrafão foi continuamente iluminado por duas lâmpadas incandescentes de 60Watt até atingir um mínimo 4x10⁶ cel/ml. Atingindo o número mínimo de células, o garrafão encontra-se em condições para se realizar a inoculação da cultura “em massa”. Na Fig. 14 pode-se observar um dos garrafões utilizados como inóculo.



Fig. 14 - Garrafão com 4,5 litros de cultura de *Chlorella vulgaris* que servirá de inóculo.

De notar que o objectivo deste passo não consiste em otimizar as condições de cultura nem maximizar os teores em óleo da células obtidas, mas sim produzir biomassa suficiente para avaliar os diferentes processos de extracção de óleo.

2.1.2 Produção das microalgas “em massa”

A partir da cultura realizada em laboratório e do respectivo volume de inóculo preparado, prossegue-se à cultura “em massa”. A cultura em massa consiste no cultivo da microalgas *Chlorella vulgaris* no maior volume de meio que foi possível, de forma a dispor da quantidade de biomassa necessária aos ensaios de extracção. Desta forma recorrendo ao inóculo de 4,5 litros cultivados em laboratório foram inoculados diariamente 8 garrações de plástico com a densidade final aproximada de $2,5 \times 10^4$ células por ml. Esses garrações de plástico (correntemente utilizados na venda de água mineral), foram devidamente esterilizados e continham 4 litros de meio de cultura. Os garrações foram colocados num armário de cultura especialmente concebido para esse efeito. O armário de cultura possui um sistema de iluminação juntamente com um sistema de ar comprimido. O sistema de agitação foi obtido através da inserção de ar comprimido no interior de cada garração, permitindo a distribuição uniforme das células pela cultura.

A produção em massa foi efectuada semanalmente segundo o esquema representado na figura seguinte.

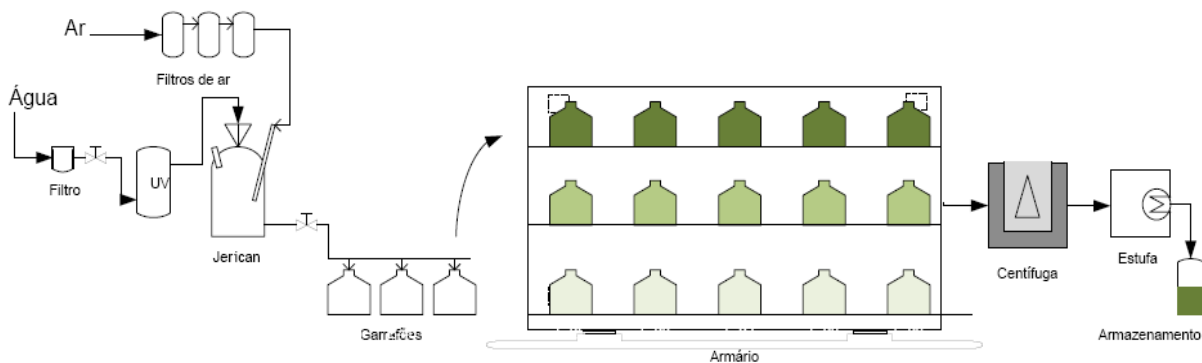


Fig. 15 - Representação esquemática da produção em massa.

2.1.2.1 Meio de cultura

A cultura de microalgas requer a preparação de meios adequados ao seu crescimento. Procurou-se providenciar as condições adequadas para manter a espécie em laboratório e para a produção de biomassa ao longo das várias semanas. Para a cultura em laboratório foi preparado, em água desionizada, o meio MWC (*Modified WC Medium*), conforme o protocolo disponível em anexo (protocolo1), que é um meio completo com vitaminas e micronutrientes. O meio utilizado para produzir o garrafão que servirá de inóculo e empregue na produção “em massa” foi preparado partir de água da rede tendo por base o meio 3N-BBM (*Bold-Basal Medium with 3-fold Nitrogen, modified*), utilizando apenas os “macronutrientes”. O protocolo de preparação do meio 3N-BBM está disponível em anexo (protocolo2).

2.1.2.2 Esterilidade dos processos de cultura

A esterilidade foi um factor levado em consideração ao longo de todo o processo de cultura. A contaminação biológica influencia de um modo considerável o desenvolvimento das microalgas, bem como a qualidade do produto final. Para evitar a contaminação biológica foram tomadas medidas ao nível da utilização da água da rede, ar comprimido e contacto da cultura com o ar.

2.1.2.2.1 Esterilização de meios e material utilizados na cultura em laboratório

A cultura mantida em laboratório, foi cultivada empregando meios esterilizados pelo processo de autoclavagem, ou seja, os meios foram esterilizados por calor húmido eliminando qualquer contaminação biológica. A autoclavagem foi ainda utilizada na esterilização de outro material de vidro necessário à cultura das microalgas.

2.1.2.2.2 *Processo de tratamento de água*

A cultura de microalgas “em massa” utilizou a água da rede pública. Esta pode apresentar algum nível de contaminação biológica, principalmente após o seu contacto com o ar. Assim, a água utilizada na cultura foi devidamente tratada em dois estágios. O primeiro estágio de tratamento consiste na passagem da água através de um filtro de fio que tem por objectivo reter as partículas de maiores dimensões como areias. O segundo estágio é realizado através da passagem por um dispositivo que submete a água à radiação de uma lâmpada de ultravioleta (UV), o que permite eliminar os microorganismos, parasitas e vírus, não alterando o pH nem as propriedades físico-químicas da água. A lâmpada e a sua descrição estão representadas na Fig. 16 e na Tabela 4 respectivamente.



Fig. 16 - Dispositivo de esterilização por UV.

Ultravioleta	IP44
Modelo Marca	AN-25 De - Barry
Output	25 Watt
Lâmpada	G25T8
Capacidade	2500 l/h
Duração	12000 h

Tabela 4 - Propriedades do dispositivo de esterilização por UV.

2.1.2.2.3 *Processo de tratamento do ar*

Na cultura realizada em laboratório, a esterilidade do ar comprimido introduzido no garrafão (que servirá de inóculo à fase de cultura seguinte) é garantido por meio de filtros de seringa com um poro de $0,2\ \mu\text{m}$ colocados na linha de ar. No processo de cultura das microalgas em massa, foi utilizado o ar comprimido disponível em rede, tendo sido sujeitado a tratamento. Isto porque durante o processo de compressão, o compressor de ar concentra os contaminantes e, em função do desenho e do tipo de compressor, pode inclusive aumentar o grau de contaminação do próprio ar por arrasto de partículas de óleo do compressor. Para eliminar esse problema, foram instalados três filtros com diferentes graus de filtragem, GP, HE e AC. A Fig. 17 e a Tabela 5 ilustram a representação dos 3 filtros e respectivas especificações.



Fig. 17 - Filtros de ar.

Marca	INGEROLL RAND		
Modelo	GP	HE	AC
Retenção de Partículas Sólidas (μm)	1	0.01	0.001
Retenção de Condensados/Óleo (mg/m^3)	0.5	0.01	0.001

Tabela 5 - Especificações dos filtros de ar.

Os três filtros de ar comprimido, com purgador automático e manômetro diferencial estão de acordo com a ISO 8573.1. O elemento filtrante (grau GP), coalescente (grau HE) já garantem um ar de boa qualidade, no entanto foi adicionado o terceiro elemento (grau AC) para garantir uma qualidade e esterilidade superior.

2.1.2.2.4 *Esterilização de meios e material utilizados na cultura “em massa”*

Os recipientes utilizados na preparação dos meios e na cultura das microalgas foram desinfetados com lixívia comercial. O meio de cultura foi preparado num “jerrican” a partir de uma solução concentrada de sais. O processo de enchimento dos garrafões realizou-se com as devidas precauções relativamente à contaminação existente no ar. As várias ligações entre os garrafões e o “jerrican” foram realizadas recorrendo sempre a pequenas pulverizações de álcool etílico. Os garrafões são posteriormente colocados no armário de cultura onde se realiza o processo de desenvolvimento.

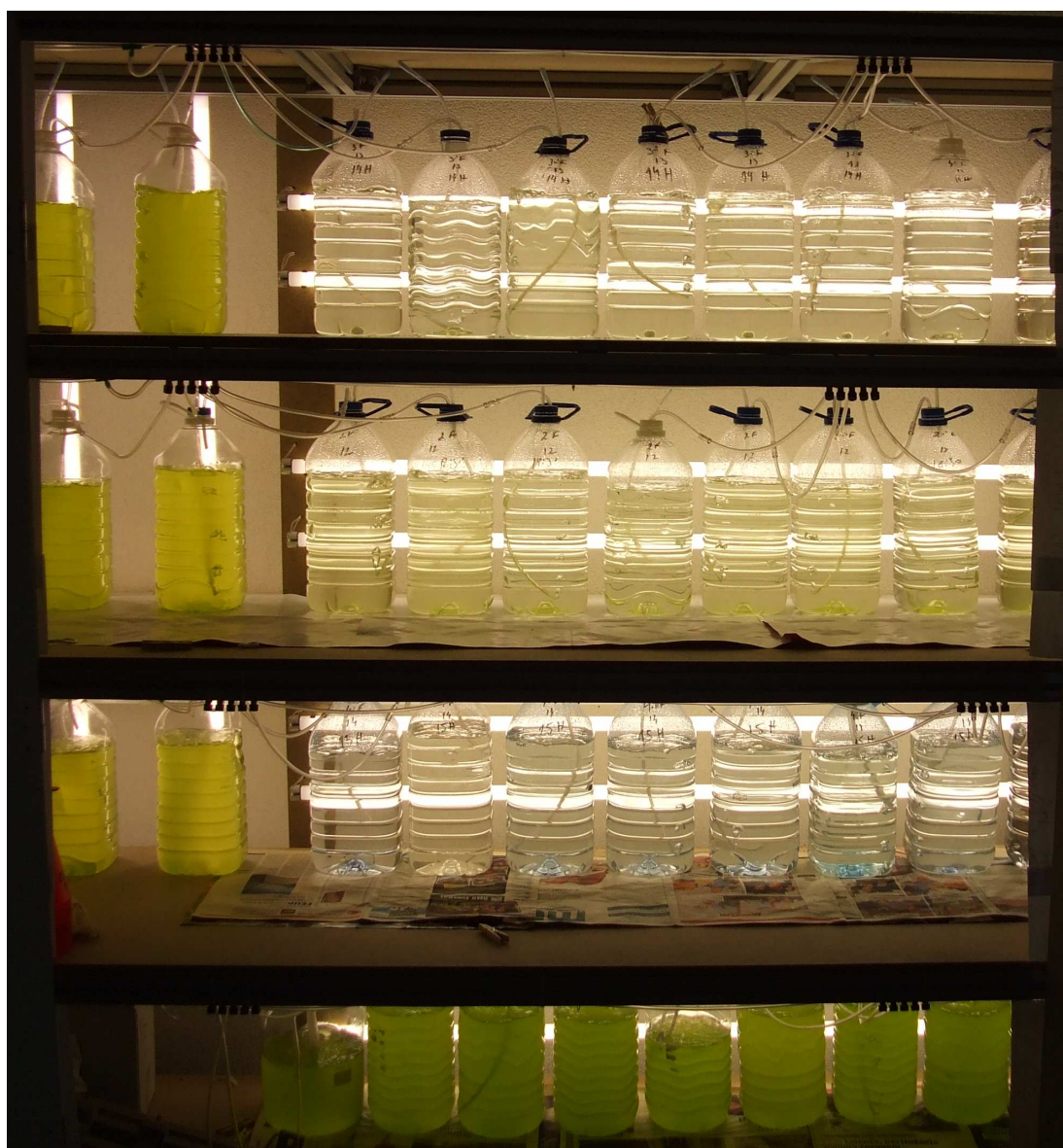


Fig. 18 - Armário de cultura.

2.1.2.3 Sistema de iluminação

O sistema de iluminação é um factor extremamente importante para o desenvolvimento da cultura devido ao rendimento fotossintético. A selecção do sistema de iluminação levou em consideração os seguintes factores:

- Intensidade Luminosa
- Índice de Reprodução de Cor (IRC)
- Temperatura de Cor

Teoricamente, as condições ideais de intensidade luminosa são $2000 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ (4300 lux) do espectro visível mais propriamente radiação azul e vermelho, 4000 K de temperatura e um IRC de 80.

A lâmpada seleccionada apresenta a seguinte distribuição espectral de energia.

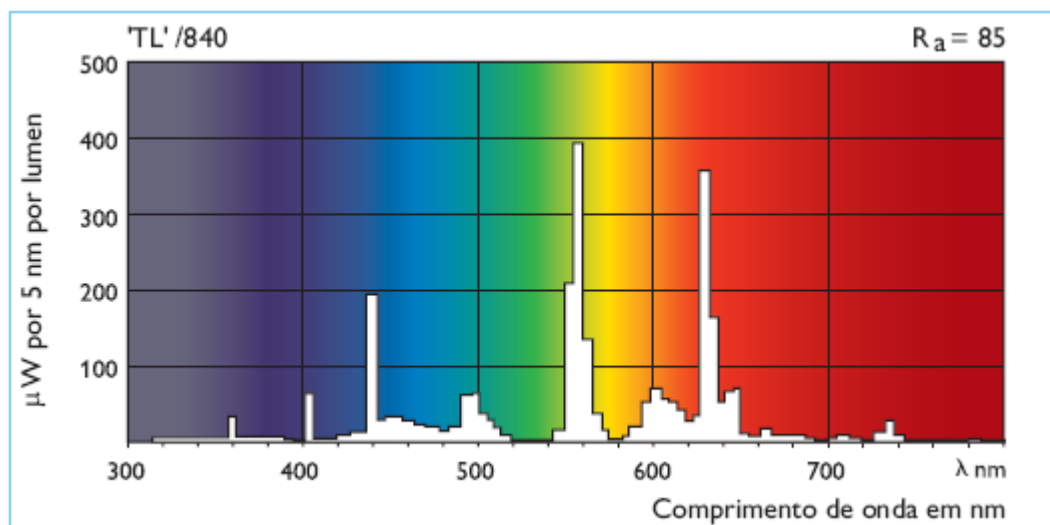


Fig. 19 - Distribuição espectral de energia.

2.1.2.4 Monitorização da cultura de algas

A cultura de algas foi monitorizada ao longo do tempo por amostragem através de três parâmetros complementares: o peso seco, número de células por ml e absorvância a 750 nm.

2.1.2.4.1 *Peso seco*

O peso seco foi determinado por filtração em vácuo de uma amostra da cultura 50 ml com filtros de celulose de porosidade 2.5 μm (referência: G42 Whatman) previamente tarados. Após a filtração da amostra, os filtros são secos durante 4 horas a 40 °C e deixados a arrefecer antes de serem pesados. O resíduo seco é expresso em g/ml.

2.1.2.4.2 *Densidade células*

Uma amostra de células (10 ml) é retirada e fixada com uma gota de soluto de lugol (aproximadamente 30 μl) para posterior contagem. As amostras são contadas numa câmara de contagem (ou hemocitómetro) de Neubauer melhorado (*Improved Neubauer*). A menor divisão dessa câmara corresponde a um volume de 0,25 nl sendo o volume das quadrículas contadas (assinalado a vermelho na Fig. 20) de 4 nl. São contadas no mínimo 9 dessas quadrículas num microscópio óptico de transmissão em ampliação de 400x.

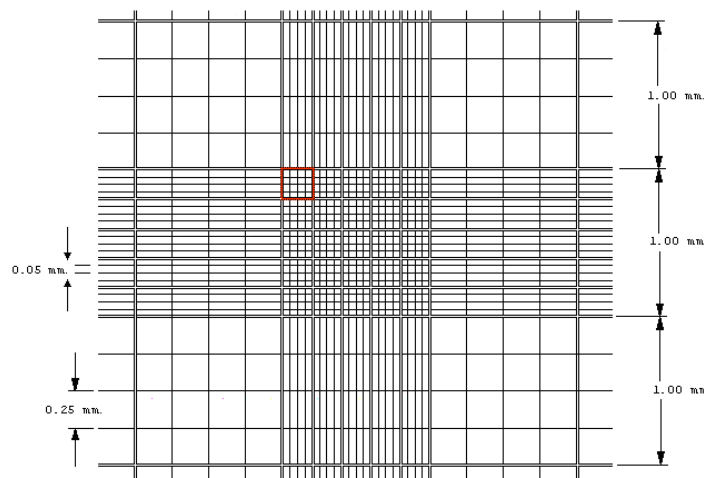


Fig. 20 - Grelha de contagem da câmara de Neubauer *Improved*.

2.1.2.4.3 *A absorvância a 750 nm*

A absorvância corresponde a uma medida indirecta da densidade celular e peso seco. Baseia-se no princípio de Beer-Lambert e corresponde a um método rápido de estimar a densidade celular e peso seco. As leituras foram realizadas no espectrofotómetro (Hach Lange GmbH DR 2800). A absorvância da amostra foi medida contra o meio de cultura e diluídas sempre que o valor excedia 0,200 para garantir a linearidade da medição. Foi escolhido o comprimento de onda de 750 nm (na zona dos infra-vermelho) de modo a que a cor da amostra não interfira com a leitura. Os resultados são expressos em unidades de absorvância já corrigidas para a diluição correspondente.

2.2 *Processamento da biomassa*

Após atingir a densidade celular adequada as células devem ser recolhidas, secas, e os lípidos extraídos de forma a obter o óleo necessário à produção de biodiesel. As metodologias a seguir descritas foram escolhidas tendo em vista o processo mais económico e mais adequado ao fim em vista. Procurou-se assim reduzir os passos de destilação e adoptar os solventes que possam ser utilizados directamente na etapa de transesterificação.

2.2.1 *Centrifugação*

Após atingido um número máximo de células por litro, considera-se a cultura em condições ideais para ser recolhida. O passo seguinte consiste na separação das microalgas do restante meio de cultura por centrifugação. Neste processo, foi utilizada uma centrífuga de alta velocidade (Beckman Avanti J-25 I). A cultura de microalgas foi centrifugada em lotes de 1,5l (6 tubos de 500ml cada) a velocidade de 5500 x g durante 3 minutos à temperatura ambiente. Após cada centrifugação, o material sólido foi ressuspenso num pequeno volume e transferido para um tubo de plástico rolhado.

2.2.2 Secagem da biomassa

Antes de se proceder à extracção do óleo contido nas microalgas é necessário passar por uma etapa intermédia, a secagem. A etapa de secagem trata-se de um passo bastante importante uma vez que a presença de água afecta consideravelmente a qualidade e o rendimento do produto final. Embora tivessem sido realizados ensaios prévios num liofilizador, a secagem em estufa foi o método aplicado à maioria da biomassa.

2.2.2.1 Estufa

O processo de secagem da biomassa foi realizado em estufa de ventilação livre (Memert 100-800, Fig. 21) através da colocação do material em placas de Petri. O tempo de secagem é variável uma vez que depende directamente do teor de humidade do lote. A determinação da temperatura óptima de secagem é igualmente importante, uma vez que o excesso de temperatura poderá degradar a biomassa e o respectivo óleo. Foram testadas diferentes condições de tempo e temperatura, de 35 °C a 60 °C para períodos de tempo variáveis entre 1 e 6h. Na Fig. 22 encontra-se representado uma placa de Petri com biomassa húmida e a mesma depois de sujeita ao processo de secagem.



Fig. 21 - Estufa de ventilação livre. Aspecto exterior e estufa aberta com placas de Petri com biomassa a secar.

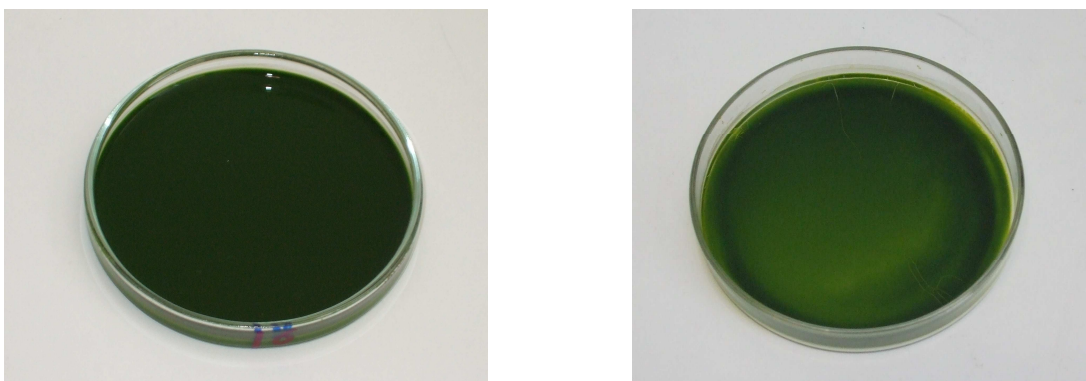


Fig. 22 - Placa de Petri com material húmido e após à secagem.

2.2.2.1.1 *Armazenamento do material seco*

Depois do material devidamente seco na estufa, foi retirado das placas de Petri com a ajuda de uma espátula e armazenado num excicador à temperatura ambiente. Na figura seguinte pode-se observar o material devidamente solto e pronto para ser armazenado.



Fig. 23 - Placas de Petri com material seco e desagregado.

2.3 *Processos de extracção*

Como já foi referido anteriormente, o objectivo deste trabalho consiste em analisar as melhores técnicas de extracção com o objectivo à produção de biodiesel. Aliado a este objectivo, pretende-se também estimar o melhor tempo de extracção paralelamente à racionalização de energia. Para alcançar os objectivos propostos, foi testado o método de ultra-sons em conjunto com vários solventes orgânicos.

A técnica de ultra-sons é muito utilizada em vários processos, pode servir de agitação ou como auxílio em processos de extracção. As técnicas utilizadas foram as seguintes:

- Banho de ultra-sons
- Sonda de ultra-sons

O banho de ultra-sons, também conhecido por geradores de ondas ultra-sónicas de baixa frequência, são comumente empregues em laboratórios de química e biologia, seja para a limpeza de materiais, rompimento das paredes celulares ou solubilização de sais. O banho de ultra-sons testado (Utrason-H da selecta Fig. 24) possui um temporizador mecânico 0-15 minutos e um termóstato analógico 0-75 °C para aquecimento. O banho apresenta uma construção em aço inox com uma cuba estampada e uma válvula de descarga. Possui uma potência máxima (constante) de operação não regulável de 720W e uma ligação eléctrica de 230V para uma frequência de 50/60Hz.



Fig. 24 - Banho de ultra-sons.

O funcionamento do banho de ultra-sons assenta sobretudo em duas partes fundamentais, o gerador de frequência e um transdutor. O gerador de ultra-sons são aparelhos que convertem a frequência da rede de 50Hz num sinal de alta-frequência. Este sinal é transmitido ao transdutor que o transforma em ondas sonoras que transmitidas para um meio líquido originam cavitação. Um transdutor é um dispositivo que converte um tipo de energia em outro tipo de energia. Normalmente o tipo de transdutor utilizado neste tipo de aparelhos é do tipo piezoeléctrico, é o componente responsável pela transformação da energia eléctrica de alta/baixa frequência em energia mecânica através do som (vibração). O transdutor tem como componente principal de sua montagem, a cerâmica piezoeléctrica, que é um componente que apresenta variações de forma quando se aplica a ele um campo eléctrico. Este fenómeno é chamado de piezoelectricidade e os materiais que o apresentam são chamados de piezoeléctricos. O banho de ultra-sons é constituído por um ou mais cristais na parte inferior do vaso metálico no qual é inserido um líquido (normalmente água) que é responsável pela transmissão das ondas. Aplicada uma dada diferença de potencial nas faces laterais do transdutor são provocadas vibrações nas faces perpendiculares do dispositivo e estas vibrarão a uma frequência pré determinada.

A sonda de ultra-sons utilizada em laboratório (Bioblack –scientific-vibracell Fig. 25) é um aparelho que possui 750 W de potência possibilitando o controlo dos vários parâmetros de funcionamento. Permite controlar parâmetros como o tempo de operação, energia inserida no processo, tipo de sinal (contínuo ou pulsado) e temperatura através da consola externa.

A sonda encontra-se ligada à consola externa através de um cabo eléctrico, permanecendo numa caixa isolada com cortiça devido às excessivas vibrações produzidas.



Fig. 25 - Sonda de ultra-sons e respectiva consola.

2.3.1 Solventes utilizados

Juntamente com a técnica de ultra-sons, foram utilizados vários solventes orgânicos no processo de extracção, clorofórmio, hexano, metanol e etanol. Na Tabela 6 encontram-se representadas algumas propriedades dos solventes utilizados. Os valores representados na tabela correspondem a uma temperatura de 300K (27 °C).

Tabela 6 - Parâmetros físicos dos solventes utilizados.

Solvente Utilizado	Fórmula Química	P. Molar (g/mol)	P.Ebulição (°C)	Densidade (g/cm ³)	Pureza (%)	Viscosidade (Pa·s)
Clorofórmio	CHCl ₃	119,38	61,2	1,48	99,8	0,530×10 ⁻³
n-hexano	C ₆ H ₁₄	86,17	69	0,66	99	0,297×10 ⁻³
Metanol	CH ₃ OH	32,04	65	0,792	99,8	0,560×10 ⁻³
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	46,07	78,4	0,789	99,5	1,20×10 ⁻³

2.3.2 Procedimentos iniciais

Os primeiros ensaios realizados tiveram como objectivo estabelecer os parâmetros de trabalho tais como, o melhor método de extracção, melhor solvente e o menor tempo de extracção.

2.3.2.1 Determinação do melhor método de extracção

A extracção focalizou-se na utilização dos dois métodos de ultra-sons existentes em laboratório, paralelamente aos solventes orgânicos, no sentido de encontrar a melhor combinação entre eles. Para seleccionar o melhor sistema de ultra-sons, foram realizados vários ensaios através de várias amostras que continham cerca de 2 g de biomassa previamente pulverizada num almofariz de forma a obter um pó de reduzida granulometria. A essa biomassa foram adicionados 60 ml do solvente em estudo.

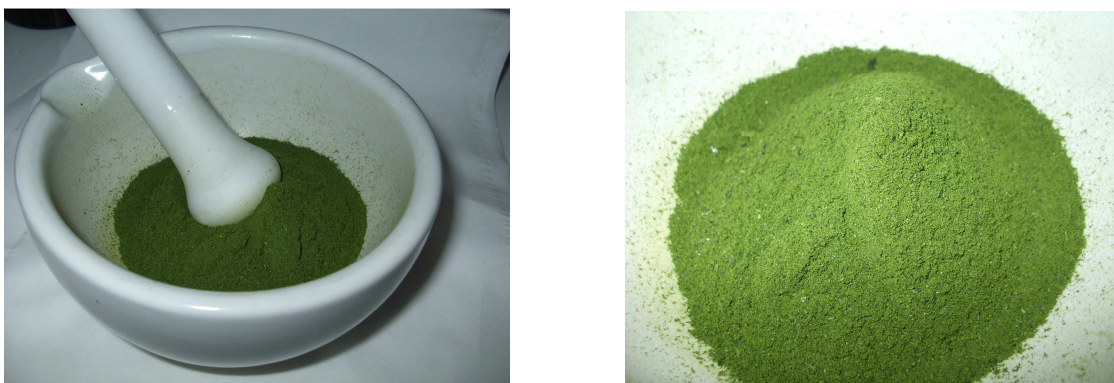


Fig. 26 - Biomassa triturada num almofariz.

Através da utilização do clorofórmio e metanol, foram realizados três ensaios em cada sistema (banho e sonda) durante um período de 15 minutos perfazendo assim um total de 12 ensaios, permitindo concluir qual o melhor sistema de extracção. A quantidade de solvente utilizado não foi optimizada, optou-se pela utilização de um volume em excesso para impedir a saturação do solvente. O mesmo procedimento foi efectuado em relação ao tempo de operação, os ensaios efectuados realizaram-se durante um longo período de tempo de modo a garantir o máximo rendimento de extracção.

A potência de trabalho disponível no banho de ultra-sons, não oferece qualquer possibilidade de controlo, no entanto, a potência de operação da sonda de ultra-sons foi definida como sendo 35% da potência máxima. Posteriormente a cada ensaio de extracção em ambos os processos, a separação da fase líquida (solvente com óleo) da fase sólida (resíduos), foi realizada por decantação seguida por centrifugação (Straight8-5k-Lw scientistc) durante 3 minutos a uma velocidade de rotação de 4000rpm, sendo finalmente a fase líquida armazenada num balão volumétrico. A biomassa húmida foi seca em estufa a uma temperatura de 85 °C durante 40 minutos, determinando-se assim a quantidade de óleo extraído através da diferença do peso seco.

2.3.2.2 Selecção do melhor solvente orgânico

Após a selecção do melhor aparelho de extracção, efectuaram-se vários ensaios com o intuito de identificar o melhor solvente. Foram realizados três ensaios com cada um dos solventes apresentados na Tabela 6 com os mesmos parâmetros apresentados anteriormente (tempo e volume de solvente).

2.3.2.3 Determinação do melhor tempo de extracção

Definido a melhor conjugação de extracção (solvente e aparelho), procurou-se de igual forma definir o melhor tempo de extracção, optimizando o processo em termos de energia e tempo. Inicialmente, os ensaios realizaram-se durante um período de tempo de 15 minutos, sendo reduzido progressivamente até se atingir o tempo mínimo necessário de extracção.

2.3.3 Procedimento experimental

Estabelecendo a melhor combinação das variáveis anteriores, os ensaios realizados tiveram como objectivo caracterizar quantitativamente e visualmente o óleo extraído pelos vários solventes.

2.3.3.1 Quantificação do óleo extraído através de cada solvente

Empregando a biomassa seca e finamente pulverizada realizaram-se as extracções de óleo conforme o procedimento previamente optimizado. De seguida procedeu-se a análise quantitativa do óleo extraído por cada solvente. Depois do processo de decantação e centrifugação, a mistura do solvente com óleo ta sujeita a um processo de evaporação com árgon. Este processo permitiu evaporar o solvente e reter os restantes elementos extraídos. A quantificação da extracção foi realizada pela diferença de peso da biomassa seca e antes da extracção, e pelo aspecto visual do resíduo extraído.

Capítulo III

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos referentes a todo o processo experimental, desde o processo de cultura e tratamento da biomassa até às extracções pelos diferentes procedimentos.

3 Resultados da cultura da microalga *Chlorella*

A cultura de *Chlorella vulgaris* realizada “em massa” foi monitorizada pela medição de vários parâmetros: densidade celular, peso seco e absorvância a 750nm. Os gráficos seguintes foram construídos com base nos dados recolhidos a partir de 4 lotes de cultura *Chlorella vulgaris* independentes realizadas em garrações de plástico. Estes foram inoculados com aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células/ml no “dia 0”. Na Fig. 27 é visível logo a partir do primeiro dia o aumento de células que evolui, até estabilizar a partir do 7º dia, na densidade de $\approx 2,5 \times 10^6$ células/ml. O peso seco, por sua vez vem representado no Fig. 28 também aumenta ao longo dos 9 dias de cultura, passando de 0,04 g/l no dia 1 a quase 0,2 g/l no 8º dia. Esta relação entre o número de células em cultura e o seu peso seco era naturalmente esperada. Com base nestes dois parâmetros é possível estimar o peso seco individual de cada célula. Este rondará $6,8 \times 10^{-12}$ g por célula com uma variação de ~20% entre as diferentes culturas monitorizadas. A variação advém da disparidade do volume das células que por sua vez será consequência da fase de crescimento em que se encontram. Assim podemos afirmar que células em intensa divisão celular serão tendencialmente mais pequenas do que as células que possamos encontrar numa fase estacionária.

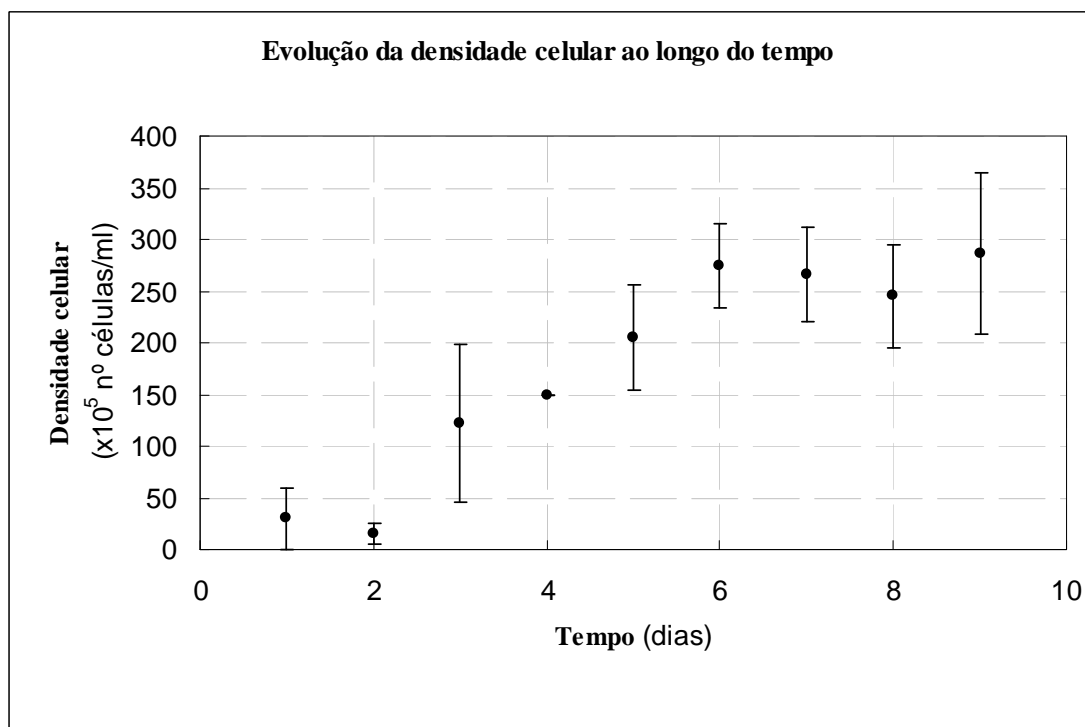


Fig. 27 - Monitorização da cultura de *Chlorella* ao longo do tempo (densidade celular).

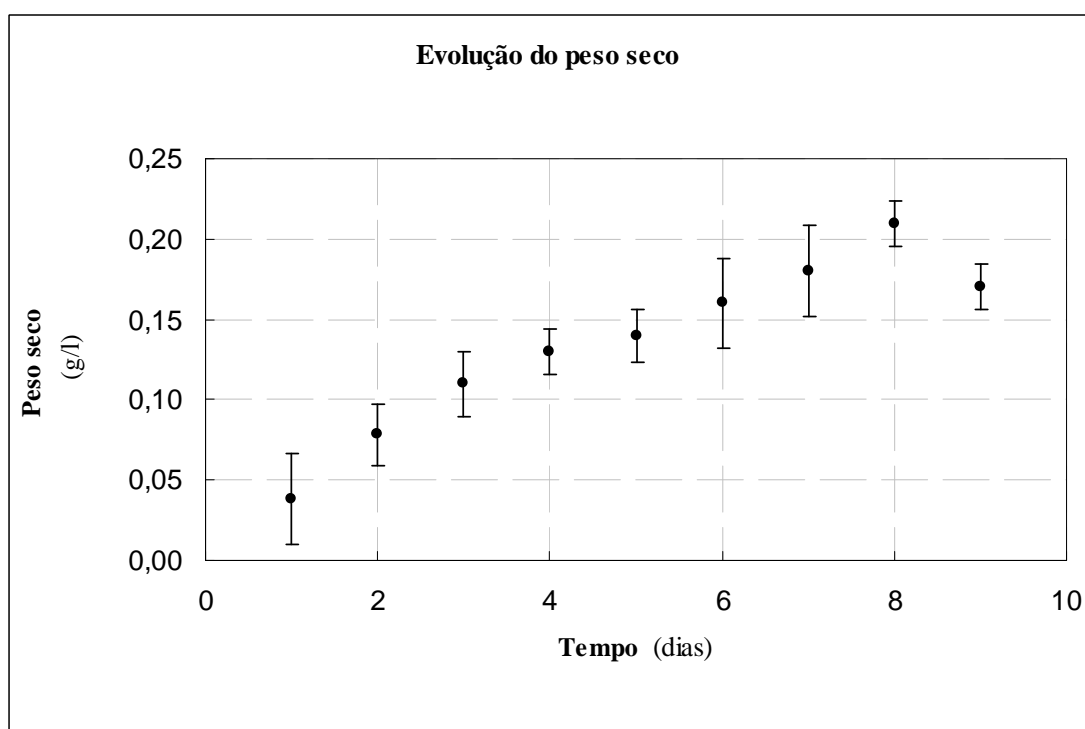


Fig. 28 - Monitorização da cultura de *Chlorella* ao longo do tempo (peso seco).

O número de células e o peso seco são dois parâmetros importantes na monitorização das culturas de microalgas, pois permitem determinar a produtividade, os tempos de recolha de células ou ainda calcular as quantidades de inóculo necessárias. No entanto, a determinação num dado momento, da densidade celular ou do peso seco obrigam a uma análise que é demorada e trabalhosa e que é impraticável quando se têm numerosas culturas a crescer simultaneamente. Assim é comum utilizar a absorvância da cultura para estimar a densidade celular e o respectivo peso seco por litro da cultura, depois de estabelecidas as respectivas correlações.

As observações realizadas nas culturas permitem estabelecer um grau de correlação entre o peso seco e a absorvância a 750 nm de densidade com um $r^2 > 0,90$. Assim é possível com base na leitura da absorvância estimar o peso seco que temos em cultura a dado momento. Os resultados levaram-nos a estabelecer a seguinte equação para o cálculo do peso seco baseados em 24 leituras.

$$\text{Peso seco (g/l)} = 0,3191 \times \text{Abs (750nm)}$$

Relativamente ao número de células é possível obter uma relação comparável com a absorvância. Os nossos dados apresentaram um $r^2 > 0,92$ tendo sido estabelecida a seguinte relação com base em 22 amostras.

$$\text{Densidade celular (10⁶ células/ml)} = 39,438 \times \text{Abs (750nm)}.$$

3.1 Resultados da centrifugação

De facto, tal como nas outras espécies de microalgas, o teor de água da cultura de *Chlorella vulgaris* é naturalmente muito elevado, cerca de 98% do peso da cultura. O que pressupõe um passo que concentre a biomassa e reduza o teor de água. As algas podem ser concentradas pela adição de sais na fase final da cultura de forma que floculem ou flutuem. Outro processo muito comum e adoptado neste trabalho, foi a centrifugação do meio. Realizamos centrifugações em lotes de 1,5 litros com posterior recolha da biomassa depositada. Este processo permitiu-nos reduzir em mais de 85% o teor de água da cultura, obtendo uma pasta com um teor de humidade próximo dos 12%. A eficiência desse processo é importante pois permite encurtar o período de secagem em estufa reduzindo a degradação dos glicerídeos em ácidos gordos por enzimas e sua oxidação por excessivo contacto com o ar quente. Na célula normal, o teor em ácidos gordos é geralmente muito reduzido comparativamente aos lípidos neutrais (triglicerídeos). Aquando da destruição da célula, várias enzimas procedem a degradação dos diversos componentes celulares. As enzimas lipases vão degradar os glicerídeos (tri, di e monoglicerídeos) armazenados na célula originando ácidos gordos e glicerol. Uma forma de reduzir a actividade dessas enzimas é diminuir o tempo de permanência de água após a centrifugação. O teor de humidade rondou os 12% porque houve a necessidade de reintroduzir um pequeno volume de meio para recolher a pasta depositada no fundo dos tubos de centrífuga, e para facilitar a sua colocação em placas de Petri para a secagem em estufa.

3.2 *Secagem da biomassa*

Como referido anteriormente, a secagem da biomassa foi realizada na estufa, segundo várias temperaturas (35, 40, 45, 50, 55 e 60 °C) e diferentes tempos de secagem. A temperatura para o qual foram obtidos melhores resultados, foi para uma temperatura de 45 °C para um tempo total de 5h. O tempo de secagem varia com a humidade da biomassa, mas também com a quantidade inserida em cada placa de Petri. Para resolver este problema, foi colocado uma quantidade mínima em cada placa de modo a formar um filme aquoso de poucos milímetros. Na Fig. 29 encontram-se representadas duas amostras secas a temperaturas de 45 e 65 °C respectivamente para um mesmo tempo de secagem de 5h.

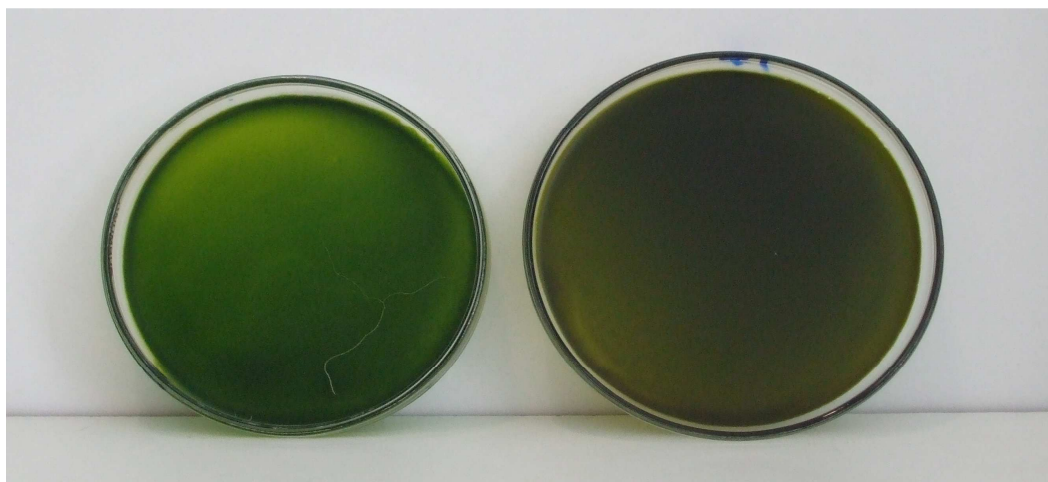


Fig. 29 - Amostras secas à temperatura de 45 e 65 °C respectivamente.

3.3 Determinação do melhor aparelho de ultra-sons

Para a selecção do melhor aparelho de ultra-sons, foram executados 6 ensaios em cada aparelho de ultra-sons com dois solventes orgânicos, o clorofórmio e o metanol, permitiu obter os resultados que se encontram apresentados na Fig. 30. Os resultados foram obtidos pela diferença de peso da biomassa antes e depois de sujeita a extracção.

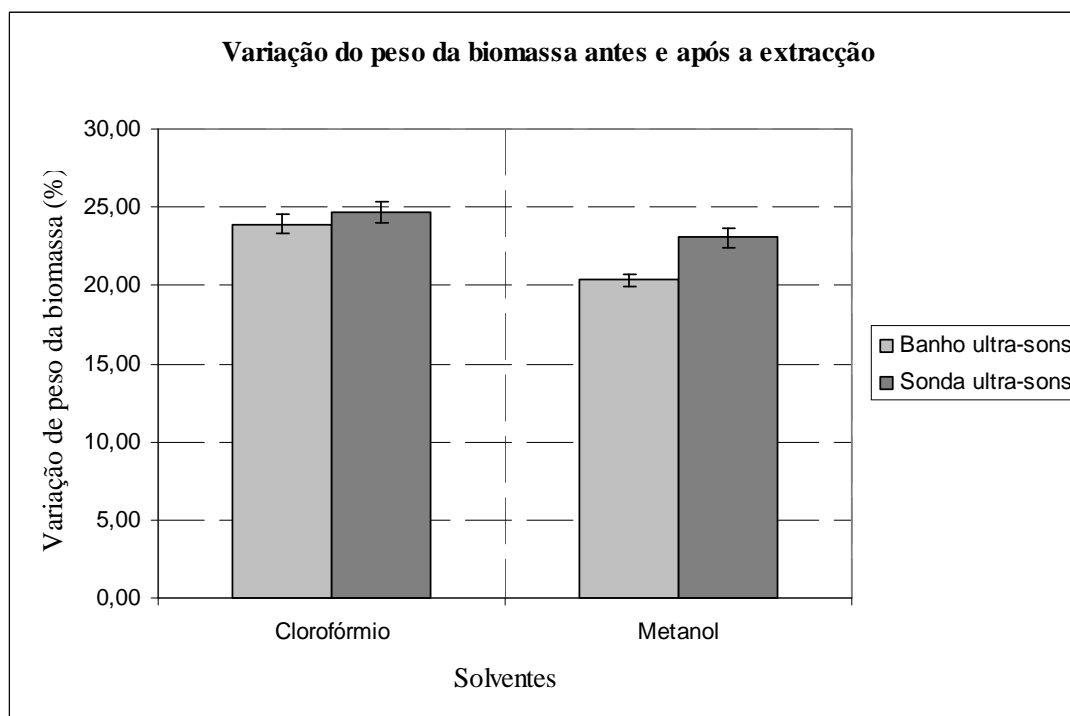


Fig. 30 - Comparação da variação do peso da biomassa antes e após a extracção com clorofórmio e metanol no banho e sonda de ultra-sons.

O grau de polaridade de ambos os solventes foi um dos factores que levou a utilização destes solventes na selecção do melhor aparelho de ultra-sons. Dos solventes utilizados o metanol é o que apresenta características mais polares, o clorofórmio por sua vez, apresenta polaridade intermédia e consequentemente grande capacidade de extracção. Segundo a bibliografia, estes dois solventes encontram-se em pontos extremos de capacidade de extracção, sendo este o factor preponderante para a sua utilização. Os resultados obtidos com os dois aparelhos são perfeitamente esclarecedores acerca das diferenças que existem nos dois métodos de extracção, qualquer que seja o solvente utilizado (clorofórmio ou metanol). De facto obtém-se melhores resultados com a utilização da sonda de ultra-sons. Em termos de potência utilizada o banho de ultra-sons operou com a potência máxima constante de 720W face aos 262W da

sonda, correspondendo a 35% da potência máxima da sonda (750W). No entanto, mesmo com uma potência máxima inferior, a sonda de ultra-sons apresenta melhores resultados devido ao seu modo de funcionamento. A sonda de ultra-sons encontra-se em contacto permanente com a amostra, logo, a energia é aplicada directamente ao material, ao contrário do banho onde as perdas por dispersão no meio condutor são maiores. Isto é, a energia aplicada pela sonda concentra-se em torno da mesma sendo por sua vez transmitida ao material circundante. A ineficiência do banho de ultra-sons deve-se às sucessivas perdas de energia devido à necessidade de ultrapassar sucessivas barreiras até atingir o material a extrair. As ondas são iniciadas no vaso metálico, tendo posteriormente que passar a barreira imposta pelo líquido (água) e por fim o copo de vidro onde se encontra a biomassa.

Os melhores índices de extracção foram obtidos com a utilização da sonda de ultra sons, optando-se assim pela utilização deste aparelho para os restantes testes a realizar.

3.4 Extracções com diferentes solventes orgânicos

Os parâmetros monitorizados durante os vários ensaios de extracção encontram-se representados na Tabela 7. Como referido anteriormente, para cada solvente foram realizados três ensaios durante um período de tempo de 15 minutos com uma amostra de biomassa de 2g e 60ml do respectivo solvente utilizado. A temperatura inicial e final foram medidas através da utilização de um termopar. A energia total aplicada é um parâmetro fornecido pela consola da sonda de ultra-sons.

Tabela 7 - Parâmetros monitorizados durante os ensaios de extracção.

Solvente	Amostra (g)	V. Inicial (ml)	V.final (ml)	T.Inicial (°C)	T.Final (°C)	Energia total (J)
CHCl₃+MeOH	2,016	60	55	26,4	52,0	42664
EtOH	2,047	60	50	24,5	74,5	61909
CHCl₃	1,948	60+20	44	24,5	69,0	57197
n-Hexano	2,049	60+20	53	25,0	72,0	53608
MeOH	2,047	60	54	25,0	74,0	54294

A quantidade da amostra e de solvente utilizado foi aproximadamente igual para todos os ensaios, no entanto, no decorrer da operação houve a necessidade de se adicionar mais 20ml à amostra de hexano e de clorofórmio para repor as perdas por evaporação. A temperatura final do clorofórmio e do hexano ultrapassou a temperatura de ebulição em 7 e 3 °C respectivamente. Este factor pode estar relacionado com a condutividade térmica de cada solvente à temperatura de operação. Para uma condutividade térmica baixa, a temperatura de operação aumenta devido à reduzida capacidade de dissipar calor.

A energia envolvida no processo depende do tipo de solvente utilizado. Quanto maior for a viscosidade do solvente, maior será a resistência imposta à propagação das ondas resultando assim num maior consumo energético. Foi no etanol que se verificou o maior consumo de energia com uma potência aplicada de 69W face aos 59,56W empregues no caso do hexano. A diferença do consumo energético está relacionada com a diferença de viscosidades, não se tratando no entanto de uma diferença muito significativa

Em termos de extracção, os resultados obtidos com os diferentes solventes encontram-se representados na Fig. 31.

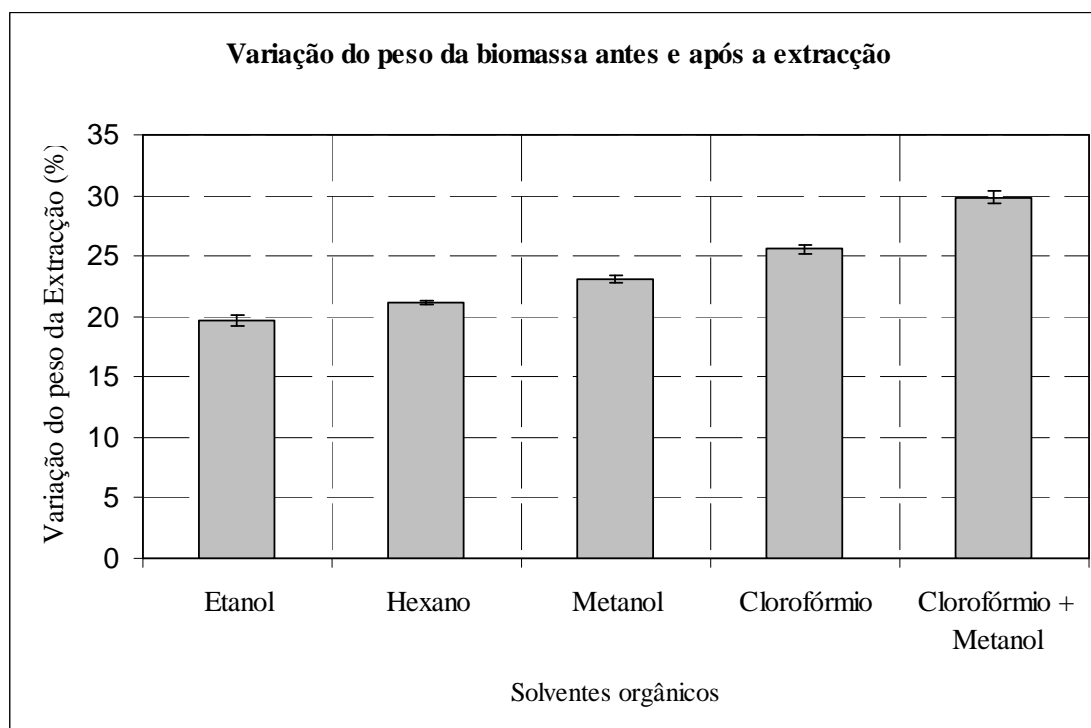


Fig. 31 - Variação do peso da biomassa antes e após a extracção com diferentes solventes orgânicos.

Em geral, os resultados obtidos com os diversos solventes encontram-se dentro dos resultados evidenciados pela bibliografia. No entanto, esperava-se uma superioridade na capacidade de extracção do n-hexano face aos álcoois.

A utilização da mistura clorofórmio e metanol, foi a solução que apresentou melhores resultados de extracção situando-se na ordem dos 30%. O clorofórmio possui uma polaridade intermédia e o metanol é fortemente polar, logo, esta conjugação de solventes apresenta grande facilidade em extrair componentes, apolares e assim como polares, como ácidos gordos livres como pigmentos fosfolípidos. Neste processo de extracção, o álcool interfere na quebra das ligações moleculares, “facilitando” o processo de extracção do clorofórmio. Apesar de ser um método que apresenta grande capacidade de extracção, a sua aplicabilidade depende da finalidade do produto extraído e das limitações logísticas inerente à utilização desses solventes.

Considerando um único solvente, o clorofórmio apresenta uma capacidade de 25,5% de extracção. Como era de esperar, o clorofórmio apresenta uma capacidade de extracção inferior ao valor anterior, uma vez que não contempla a funcionalidade do álcool. Neste caso, a “responsabilidade” da extracção é exclusivamente das características do clorofórmio, apresentando assim um valor mais baixo relativamente à mistura de clorofórmio mais álcool.

O metanol surge como o terceiro melhor solvente com uma capacidade de 23% de extracção. O valor da extracção obtido pelo metanol pode ser um indicador de dois factores distintos. O valor obtido poderá ser indicativo das características mais polares dos lípidos extraídos. Por outro lado, a percentagem extraída com metanol pode dever-se a um elevado grau de arrastamento de resíduos sólidos por parte do álcool. Estas duas possibilidades serão discutidas em extracções mais à frente.

O n-hexano surge com uma capacidade de extracção na ordem dos 21%. É um solvente considerado apolar (embora alguma bibliografia o apresente com polaridade baixa), o que favorece a extracção de lípidos de características apolares. O valor da extracção com n-hexano é um valor de referência, uma vez que teoricamente, a extracção realizada pelo n-hexano permite recuperar os lípidos neutrais (triglicerídeos) favoráveis à produção de biocombustível. Por fim, o etanol apresentou os piores resultados com cerca de 19,3%. Esperavam-se resultados mais próximos entre o metanol e o etanol não se vindo deste modo a confirmar. O

etanol, é a seguir ao metanol o álcool mais polar. O grau de polaridade diminui à medida que a sua cadeia alquila aumenta. Neste contexto, será de esperar uma maior extracção por parte do etanol.

Como já foi referido anteriormente, a eficiência das extracções foi realizada quantitativamente pela pesagem do resíduo que ficou depois de cada ensaio de extracção. Nesta medida, os resultados obtidos não são indicativos do melhor processo em termos químicos uma vez que é desconhecido a qualidade do óleo extraído. A utilização de clorofórmio nas extracções de óleo para biodiesel poderá não ser vantajosa por não ser selectiva relativamente aos lípidos extraídos, assim como pelo perigo inerente de uso deste solvente e a sua toxicidade. Relativamente ao metanol, n-hexano e etanol, seriam necessários realizar testes qualitativos das fracções extraídas para se poder discutir a possível utilização industrial para produção de biodiesel. A utilização de qualquer um destes três solventes a nível industrial implica procedimentos diferentes. Se os resultados obtidos na Fig. 31 representassem somente extracção lípidica, o solvente de selecção seria o metanol. Uma vez que os resultados não são esclarecedores acerca do tipo de lípidos extraídos, não é possível nesta fase do trabalho seleccionar o melhor solvente orgânico.

3.5 Optimização do tempo de extracção

Na tentativa de minimizar o tempo dispendido durante o processo de extracção, foram realizados vários ensaios através da utilização de metanol, etanol e n-hexano para determinar o tempo óptimo de extracção. Foram realizados simultaneamente 3 ensaios com os diferentes solventes e os resultados encontram-se no Fig. 32.

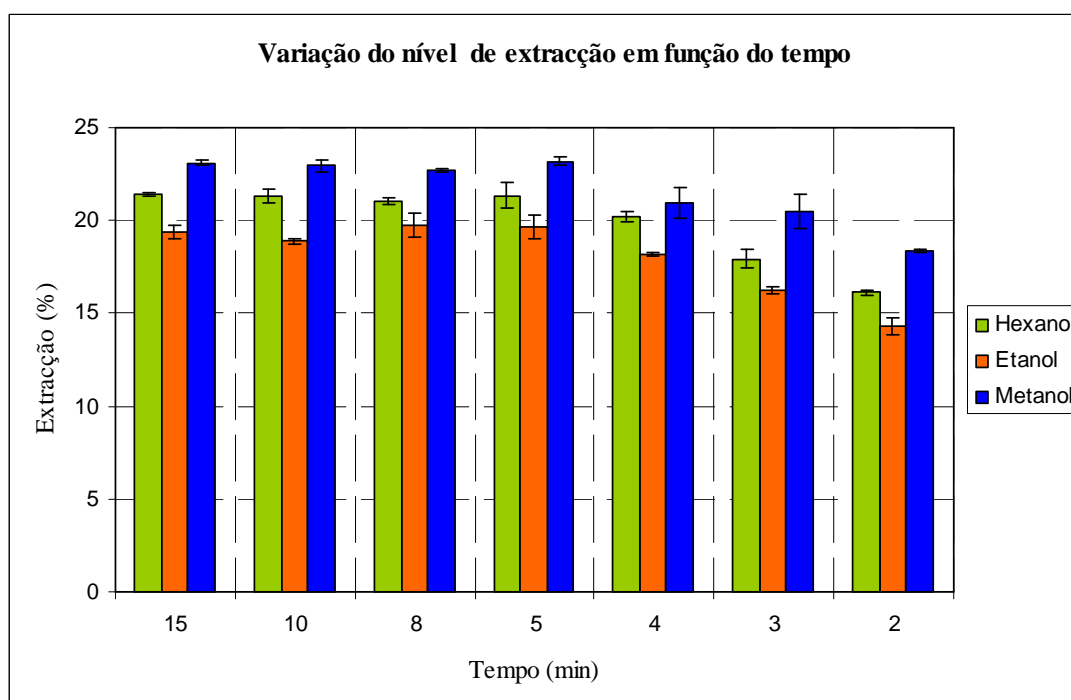


Fig. 32 - Extracção realizada com hexano, etanol e metanol para vários tempos de operação.

A percentagem das extracções realizados com os diferentes solventes começa a diminuir a partir dos 4 minutos de operação. Nestas condições, o tempo ideal de extracção foi estabelecido em 5 minutos. Dentro dos ensaios realizados com os 3 solventes, o n-hexano foi o que apresentou menores consumos de energia com cerca de 61W e o etanol o consumo mais elevado de 67W. Esta redução de tempo permite processar o material de uma forma mais rápida com uma redução do consumo de energia.

3.6 *Análise visual dos óleos extraídos com diferentes solventes*

Embora não tenha sido possível caracterizar quimicamente os resultados das extracções com vista a seleccionar o melhor solvente, procedeu-se à análise visual dos resíduos das extracções. Assim efectuou-se a evaporação dos solventes com árgon e consequente observação visual do resíduo.

Como se pode ver pelas figuras seguintes a qualidade das extracções varia consideravelmente em função dos solventes utilizados. Embora o metanol tenha sido o solvente que apresentou índices mais elevados de extracção, o material extraído não tem um aspecto uniforme. Mesmo não tendo uma análise qualitativa de cada extracção realizada, pela Fig. 33 observa-se a presença de uma elevada quantidade de resíduos sólidos e apenas vestígios de óleo. A tonalidade verde presente no balão é uma característica clara da presença de pigmentos (dos quais as clorofilas) o que evidencia a grande capacidade de arrasto do metanol.

Comparativamente ao metanol, o etanol apresenta resultados mais satisfatórios. Como pode ser observado pela Fig. 34, existe óleo no final da extracção realizada pelo etanol, no entanto, observa-se uma fase mais escura na base do balão que corresponderá a uma película de resíduos transportada pelo próprio álcool. Este tipo de procedimento não permite comparar as extracções em termos de qualidade, embora os resultados obtidos com o etanol aparentem ser superiores aos resultados do metanol. O arrasto de partículas talvez se deva à solvatação das mesmas por parte dos álcoois. Assim é possível que a menor polaridade do etanol relativamente ao metanol contribua para uma extracção mais satisfatória relativamente à homogeneidade.

Visualmente melhores resultados foram obtidos com n-hexano. Na Fig. 35 observa-se uma boa qualidade de extracção, completamente limpa de resíduos e uma clara presença de óleo. No final do processo de evaporação do solvente com árgon, foram visíveis pequenas gotas de óleo de cor “amarelo palha” no interior do balão.

Perante esta análise de resultados, o metanol mostra-se pouco propício a uma utilização a nível industrial. Para além de apresentar grande arrastamento de partículas sólidas, não apresenta praticamente vestígios de óleo. Com base na mesma caracterização, o n-hexano foi o que

apresentou resultados mais interessantes, apresentando uma extracção limpa de resíduos. Face aos objectivos deste trabalho, os resultados obtidos com etanol não podem ser desprezados. Embora com extracções inferiores às obtidas com metanol, o arrastamento de partículas é visualmente inferior. A utilização do etanol tem a vantagem de não ser necessário introduzir no processo uma etapa de destilação, uma vez que a mistura de etanol mais óleo pode seguir directamente para o processo de transesterificação com uma consequente redução de custos. No entanto, será necessário avaliar o impacto das partículas arrastadas pelo etanol no processo de transesterificação. Possivelmente poderão ser retiradas aquando da filtração do combustível. Pelas experiências realizadas ao longo deste trabalho, o melhor solvente é o n-hexano.



Fig. 33 - Resíduo resultante da evaporação do metanol com árgon.



Fig. 34 - Resíduo resultante da evaporação do etanol com árgon.

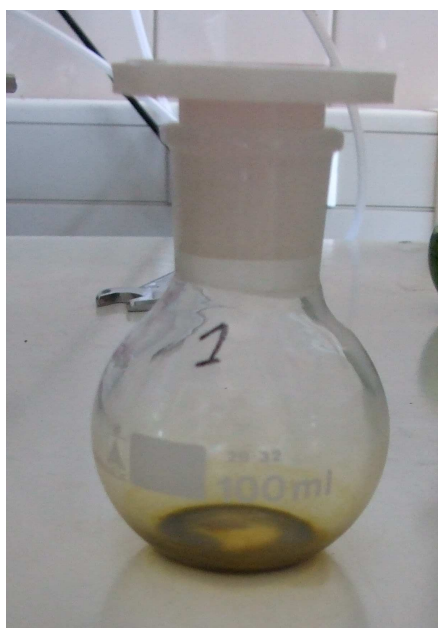


Fig. 35 - Resíduo resultante da evaporação do n-hexano com árgon.

Capítulo IV

Com base na utilização do n-hexano, neste capítulo é apresentado um pequeno projecto de extracção contínuo de óleo à escala laboratorial. Durante o processo, tanto a mistura da biomassa com o solvente, bem como o restante processo de extracção é realizado de forma automática.

4 Apresentação do sistema de extracção

Durante os ensaios práticos laboratoriais foi utilizada uma sonda com uma capacidade de 750W de potência, no entanto, a potência de trabalho foi regulada para 35% da potência máxima devido ao reduzido volume do solvente utilizado. Os ensaios práticos consistiram na utilização de 2g de biomassa e 60ml de solvente. O dimensionamento dos diversos componentes assenta nos parâmetros otimizados na componente prática, nomeadamente a utilização da mesma sonda, apenas alterando o comprimento desta para permitir a utilização de 2L de solvente no processo de extracção. Os componentes utilizados estão apresentados na tabela seguinte. Os desenhos técnicos e especificações estão representados em anexo.

Tabela 8 - Componentes utilizados no sistema de extracção

Número	Quantidade	Descrição	Material	Des. N°
1	1	Depósito da biomassa	Aço carbono	1
2	1	Guilhotina	Madeira	2
3	1	Tubo de ligação 1	Aço carbono	3
4	1	Tampa do depósito de pesagem	Aço carbono	4
5	1	Depósito de pesagem	Aço carbono	5
6	4	Fixadores	Aço	6
7	1	Suporte da célula de carga	Aço carbono	7
8	1	Célula de carga	-	8
9	1	Tubo de ligação 2	Aço carbono	9
10	1	Misturador	Aço carbono	10
11	1	Tubo de ligação 3	Aço carbono	11
12	1	Câmara de extracção	Aço carbono	12
13	1	Sonda de ultra-sons	Vários	13
14	1	Meia lua 1	Aço carbono	14
15	1	Meia lua 2	Aço carbono	15
16	2	Electroválvula (E1)	Aço cromado	16
17	1	Electroválvula borboleta (E2)	Aço cromado	17
18	2	Electroválvulas (E4 e E5)	Aço cromado	18
19	2	Electroválvulas (E3 e E6)	Aço cromado	19
20	1	Depósito do solvente	Alumínio	20
21	1	Separador de caudal	Aço cromado	21
22	1	Cilindro pneumático	-	22

4.1 Sistema de extracção

O sistema de extracção projectado para trabalhar em laboratório é apresentado nas figuras seguintes. Na Fig. 36 encontra-se representada uma vista geral de todo o sistema de extracção. A construção realizada em tijolo é meramente representativa, uma vez que se optou por colocar o depósito do solvente a uma determinada cota para aproveitar o factor da gravidade. A restante estrutura do sistema foi construída em perfil de alumínio com dimensões standard. Os elementos encontram-se representados com diferentes cores permitindo uma rápida identificação dos mesmos.

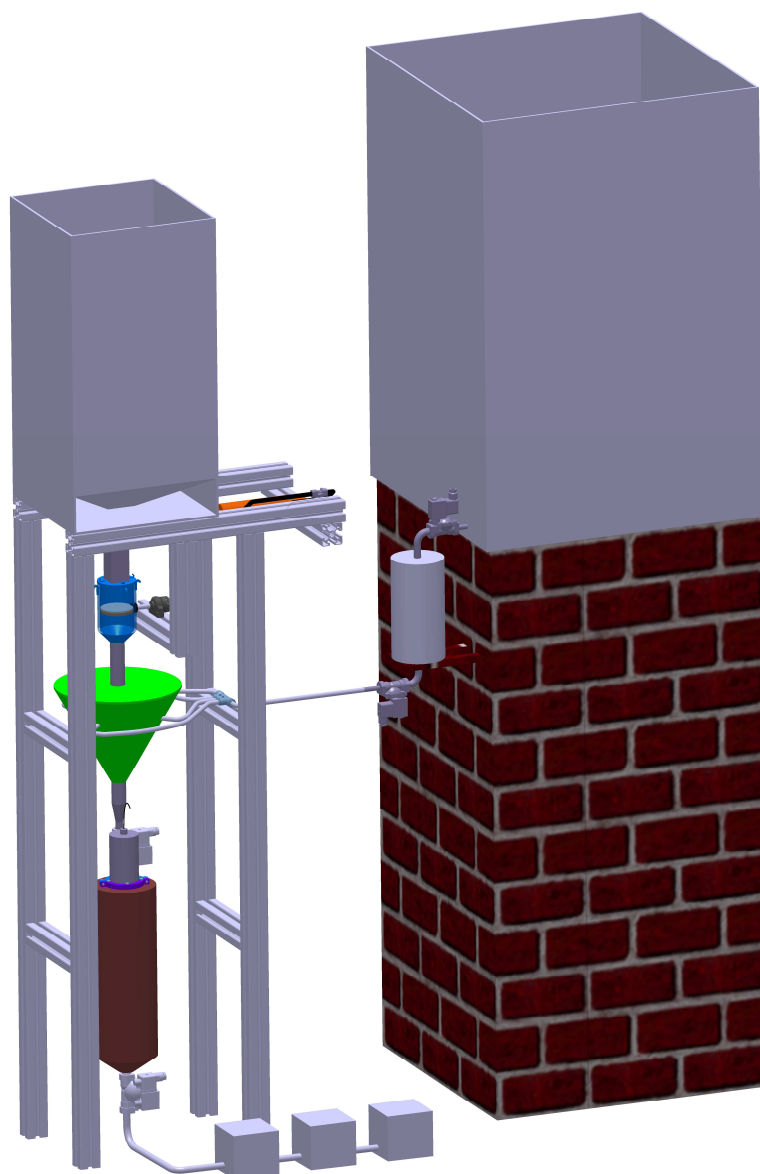


Fig. 36 - Aspecto geral do sistema de extracção.

4.2 Princípio de funcionamento do sistema de extracção

Em 5 minutos de operação (tempo otimizado), para uma capacidade da câmara de extracção de 2L processam-se aproximadamente 67g de biomassa. Para um período de trabalho de 24h, processam-se cerca de 20Kg de biomassa e são necessários perto de 580 litros de solvente. Admitindo uma perda de 5% em cada lote de extracção, serão necessários 610L. Como o solvente passa por um processo de destilação para ser recuperado, não será necessário armazenar 610L de solvente, bastando um volume de armazenamento de 300L. O sistema possui dois depósitos, um com uma capacidade de 56L para armazenar a biomassa (cuja densidade aparente é de $0,41\text{Kg/dm}^3$ determinada experimentalmente) e outro de 302,5L para armazenar o solvente.

Para se realizar as respectivas extracções, a quantidade de biomassa e o volume de solvente são previamente medidos. A quantidade da biomassa a utilizar em cada lote é pesada através da utilização de uma célula de carga que se encontra alojada dentro de um depósito denominado depósito de pesagem, sobre uma electroválvula borboleta (E2). Quando se atinge o valor desejado (67g) a biomassa é impedida de cair do respectivo depósito por acção de uma porta guilhotina controlada por um cilindro hidráulico. O cilindro abre/fecha a guilhotina perante a “ordem” da electroválvula E1 que se encontra junto ao mesmo. O volume desejado, 2L, é doseado através da utilização de um recipiente da mesma capacidade. O sistema de enchimento/vazamento é controlado por duas electroválvulas (E 4 e E5 colocadas a montante e a jusante respectivamente) e um sensor (C1). Na figura seguinte pode-se visualizar detalhadamente todos estes componentes.

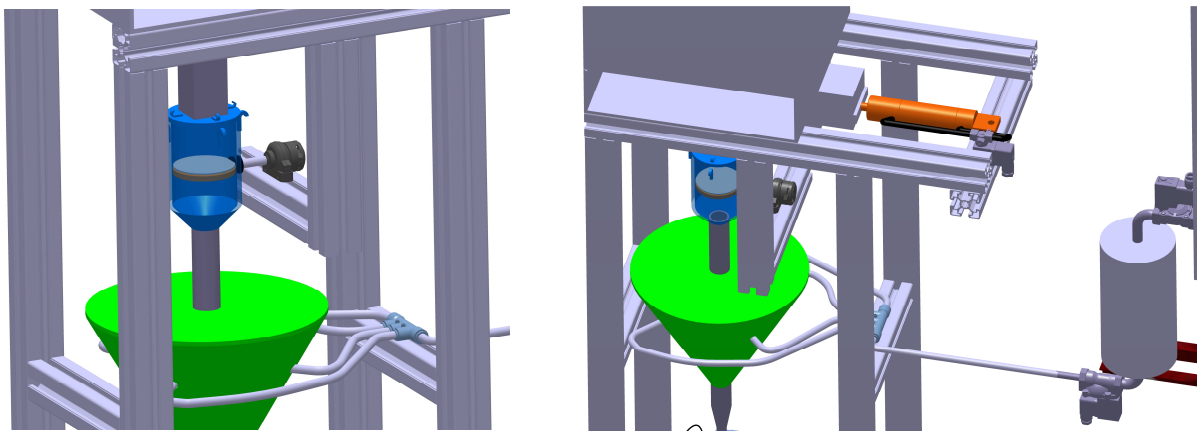


Fig. 37 - Depósito de pesagem e respectiva célula e carga. Recipiente de 2L, cilindro, porta guilhotina aberta, e respectivas electroválvulas

Posteriormente ao doseamento da biomassa e do solvente, a mistura realiza-se numa secção denominada misturador (representada a verde). Através da abertura da electroválvula E5 o solvente é inserido por gravidade no misturador através de quatro injectores. À saída da electroválvula foi colocado um distribuidor de caudal que permite dividir o caudal pelos quatro injectores, entrando posteriormente dentro do misturador. A mistura segue para a câmara de ultra-sons, quando se dá a abertura da electroválvula E3 (colocada depois do misturador). Depois de realizada o processo de extracção, a mistura abandona a câmara de extracção por intermédio da abertura da electroválvula E6. Na Fig. 38 encontra-se representado o misturador e a câmara de ultra-sons com a respectiva sonda. A sonda encontra-se fixa à câmara de extracção por acção de duas meias luas aparafusadas¹. A meia lua 1 é aparafusada à câmara por 3 parafusos H NP4 1900-ISO 4014 M4×16-5.5, que por sua vez aperta à meia lua 2 por 2 parafusos CHC ISO 1900-ISSO 472 M6×20-5.5

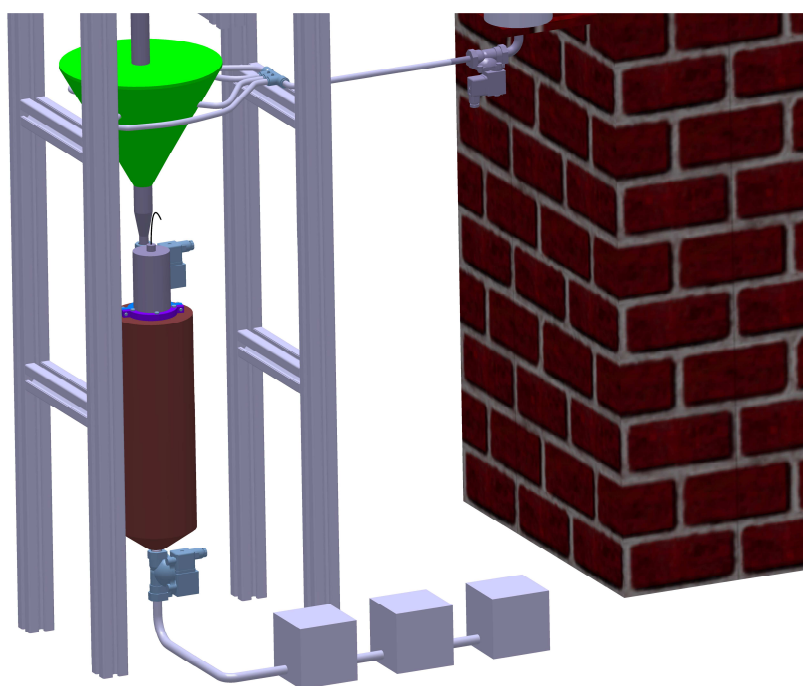


Fig. 38 - Misturador, câmara de ultra-sons e respectiva sonda.

Os 3 blocos colocados na parte inferior da figura, representam de forma esquemática as fases da decantação, destilação e transesterificação respectivamente. Em anexo encontra-se representado uma vista isométrica, uma vista explodida e uma vista em corte do sistema.

¹ Os suportes dos vários componentes, depósito de mistura, misturador e câmara de extracção, não foram colocados por simplicidade do desenho.

4.3 Controlo do sistema de extracção

O sistema de extracção não apresenta qualquer contacto com o ar, funciona de forma contínua e automática. Todo o processo é controlado de forma automática por um PLC baseado no diagrama de blocos presente na Fig. 39.

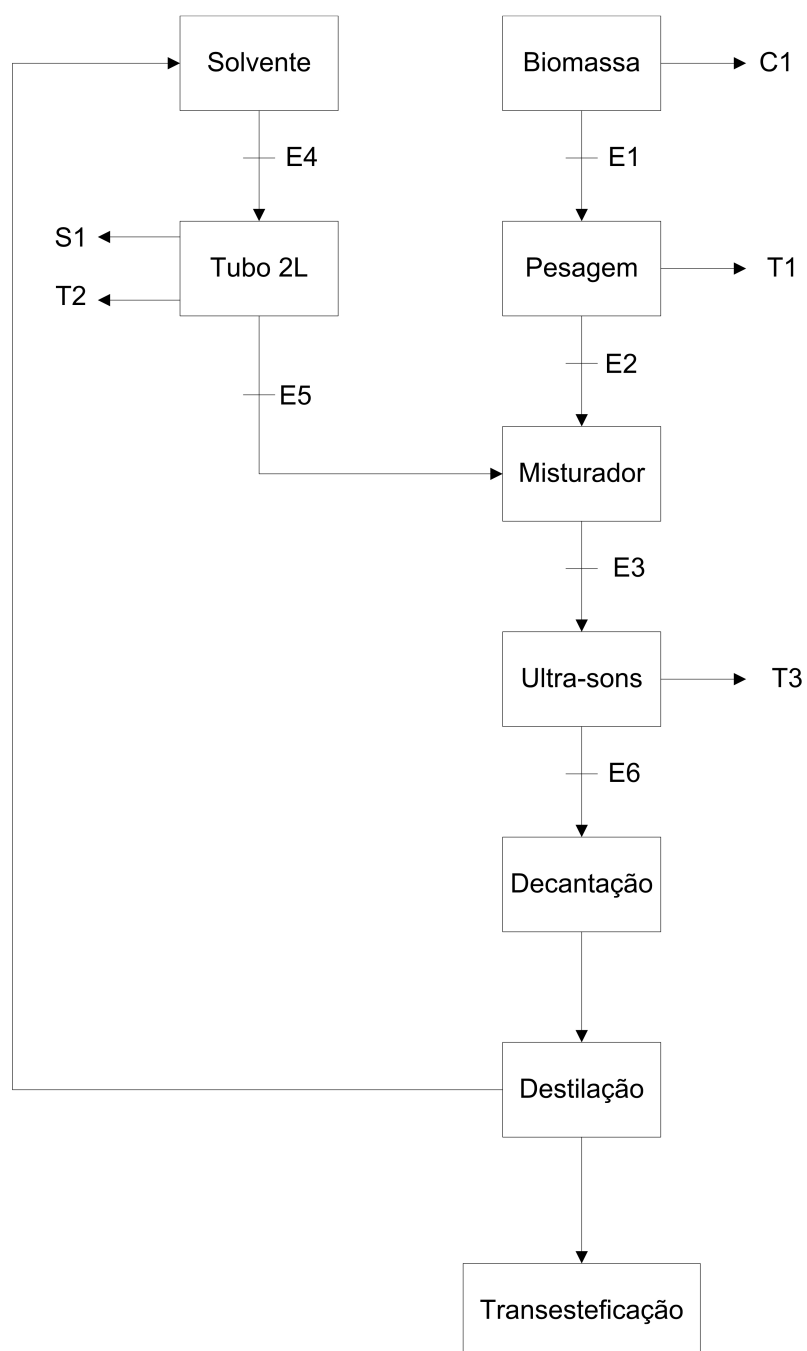


Fig. 39 - Diagrama de blocos representativo do funcionamento do sistema de extracção.

Legenda do diagrama:

C1: Cilindro 1.

S1: Sensor 1.

E1, E2, E3, E4, E5 e E6: Electroválvulas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 respectivamente.

T1, T2 e T3: Temporizador 1, 2 e 3 respectivamente.

4.4 *Funcionamento automático do sistema de extracção*

1. Inicialmente, a biomassa contida no depósito cai progressivamente para o depósito onde se realiza a sua pesagem. A determinação do peso é realizada através de uma célula de carga apoiada numa electroválvula de borboleta (E2). Quando o peso da biomassa atingir 67g, a célula de carga fornece um sinal ao temporizador T1 e à electroválvula E1.

- a. A electroválvula E1 fecha o cilindro C1. Através do acoplamento do cilindro a uma porta “guilhotina” que tem como função permitir/impedir a passagem de biomassa para o depósito da pesagem. Neste caso, a porta guilhotina e a biomassa é impedida de cair.
- b. Inicia-se simultaneamente uma contagem de 1min no temporizador T1 para permitir recolher alguns resíduos de biomassa que ainda estejam a cair. Ao fim desse tempo, o temporizador T1 volta a zero, e fornece um sinal à electroválvula borboleta E2 e iniciando a contagem no temporizador T2.

2. A electroválvula E2 ao receber o sinal, passa à posição de aberta e deixa cair a biomassa para o misturador. Simultaneamente, a electroválvula E5 abre e permite a entrada no misturador dos 2 litros de solvente contidos na coluna. Essa electroválvula (E5) irá manter-se aberta durante 1min cronometrados pelo temporizador T2.

3. Ao fim desse minuto, a electroválvula E5 e E2 fecham, e abre-se a electroválvula E4 que permite o enchimento do tubo de 2 litros. A mistura de biomassa com solvente está no misturador aguardando a abertura da válvula E3 que dá entrada para a câmara de ultra-sons. Quando o tubo de 2 litros estiver cheio, o sensor S1 emite um sinal para fechar a electroválvula E4 impedindo a entrada de mais solvente no tubo.

4. Finalizando o processo de extracção, dá-se a abertura da electroválvula E6 para se proceder à saída do material extraído e inicia o temporizador T3 de 1min. Ao fim de 30s, fecha-se a electroválvula E6, e abre-se a electroválvula E3 para que a mistura entre na câmara de extracção. Completando o segundo período de 30s, a electroválvula E3 fecha e inicia-se o novo processo de extracção com a activação da sonda de ultra-sons mantendo a câmara de extracção totalmente isolada
5. Quando se inicia o processo de extracção, o cilindro abre a porta guilhotina, a biomassa volta a cair, e repete-se novamente o ciclo.

Capítulo V

Neste capítulo são apresentadas as conclusões gerais retiradas do trabalho desenvolvido, bem como algumas sugestões para desenvolvimento em trabalhos futuros.

5 Conclusões

Este trabalho consistiu na investigação de técnicas de extracção de óleos a partir de biomassa de microalga *Chlorella vulgaris* de forma a cumprir os objectivos propostos. Relativamente a essa cultura obtiveram-se as seguintes conclusões:

Pela análise da Fig. 27 e Fig. 28 podemos concluir que em pouco mais de uma semana obtivemos um aumento médio de 0,16 g/l ou em número de células um acréscimo de 100 vezes. Considerando os valores encontrados na literatura – 0,5 g/l de peso seco e densidades de 10×10^7 células/ml parece evidente que as nossas condições de cultura “em massa” podem ainda serem melhoradas, no entanto esse não foi a preocupação deste trabalho.

Em conformidade com os ensaios realizados, a utilização da sonda de ultra-sons apresentou melhores resultados de extracção comparativamente ao banho de ultra-sons, para além de apresentar um consumo de energia menor, 70W face aos 720W do banho de ultra-sons.

Os melhores resultados de secagem foram obtidos para uma temperatura de 45 °C e um tempo de total de 5h. Melhorando o processo de centrifugação, nomeadamente a forma de recolha da pasta depositada no fundo dos tubos da centrífuga, poder-se-á diminuir os tempos de secagem uma vez que a biomassa apresenta um menor teor de humidade.

De uma forma geral, chegou-se à conclusão que os dois solventes mais interessantes em termos de utilização industrial são o n-hexano e o etanol. A selecção de um destes solventes depende de uma análise qualitativa do óleo extraído. A utilização do n-hexano implica a necessidade de uma etapa de destilação, com custos extras de equipamentos e energia, e a impossibilidade de utilização dos resíduos para fins alimentares dos animais. A utilização do etanol, apresenta vantagem de seguir directamente para o processo de transesterificação, no

entanto, a presença dos resíduos pode dificultar a reacção de transesterificação. Para ambos os solventes analisados, obteve-se um tempo óptimo de extracção de 5 minutos.

No sistema de extracção projectado, a sonda encontra-se parada 1 minuto ao fim de cada 5 minutos de operação para novo abastecimento da câmara de extracção. Significa que durante 1 hora de operação, são desperdiçados 10 minutos, ao fim do dia são desperdiçados 240 minutos, portanto 2h de funcionamento. Nessas duas horas, ficam por extrair 1,6 Kg de biomassa. O minuto desperdiçado no processo e enchimento pode ser optimizado através da colocação de sensores de presença (da mistura solvente com biomassa), permitindo deste modo controlar a entrada e a saída de um modo mais eficiente. Contudo, a introdução de mais objectos de controlo tornará mais dispêndios o custo inicial do sistema projectado.

Com a utilização de uma sonda de maior potência, permitirá elevar as capacidades de extracção para valores de biomassa superiores.

5.1 *Trabalhos futuros*

Com a realização deste trabalho e da experiência obtida, seguidamente são apresentadas algumas sugestões para complementar o trabalho desenvolvido.

- Para se poder obter conclusões mais esclarecedoras das extracções realizadas, é estritamente necessário proceder a uma caracterização qualitativa do respectivo óleo, tanto para caracterizar o melhor solvente de extracção como para prever a qualidade do produto final.
- Uma vez que o etanol apresentou melhores resultados comparativamente ao metanol, sugere-se a realização de ensaios com um álcool de cadeia alquila maior (propanol).
- Implementar um processo contínuo para se realizar a reacção de transesterificação.
- A sonda utilizada apresenta uma capacidade de 750watts de potência, no entanto só foi usufruída cerca de 35% da mesma. Sugere-se o cultivo de maiores quantidades de biomassa para se poderem realizar ensaios com maiores proporções, permitindo no futuro realizar-se extracções em lotes maiores.

Referências e Bibliografia

- [1] - <http://canada.theoildrum.com/node/2516/0>; consulta: 25/02/2008.
- [2] - http://resistir.info/energia/greenspan_07jun06.html; consulta: 12/02/2008.
- [3] - http://resistir.info/energia/pico_petroliifero.html; consulta: 12/02/2008.
- [4] - Coutinho, M.; Diário de Noticias; Suplemento de negócios; 8 de Agosto de 2005.
- [5] - dn.sapo.pt/2006/04/19/economia/crude_custou_mais_euros_mes_a_cada_p.html; consulta: 17/02/2008.
- [6] - Heywood, J.; Energy for a Rapidly Evolving World; 2006.
- [7] - http://www.greencarcongress.com/2007/03/energy_consumpt.html; consulta: 17/02/2008
- [8] - <http://www.autoinforma.pt/estatisticas.htm>; consulta: 17/02/2008.
- [9] - EDP (2008); www.edp.pt/EDPI/Internet/PT/Group/Sustainability/EnergyEfficiency/EnergeticEfficiency/Portugal/ProtocoloQuioto.htm; consulta: 10/07/2008.
- [10] - Charles, M.B.; Ryan, R. & Ryan, N. O. R.; Public policy and biofuels: The way forward; Energy Policy 35; 2007; 5737-5746.
- [11] - Bozbas, K., Biodiesel as an alternative motor fuel: Productions and policies in the Europe Union; Renewable and Sustainable Energy Reviews 12; 2008;542-552.
- [12] - Santareno, E.; Diário de Noticias; Negócios; Quinta-feira; 3 de Fevereiro de 2003; consulta: 15/03/2008.
- [13] - Mckibben, B.; National Geographic; Novembro de 2007; 3-4.
- [14] - -----
- [15] - The Non Technical Barriers Network; Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Paris – França, Julho 1998.
- [16] - FRondel, M.; Peters, J.; Biodiesel: A new Olidorado?; Energy Policy 35; 2007; 1675-1684.
- [17] - Bourne, J. J. K.; Robert C.; National Geographic; Novembro de 2007; 23.
- [18] - Bourne, J. J. K.; Robert C.; National Geographic; Novembro de 2007; 24.

- [19] – Russi, D.; On integrated assessment of a large-scale biodiesel production in Italy: Killing several birds with one stone; *Energy policy* 36; 2008; 1169-1180.
- [20] – Teixeira, J., A.; *Diário de Notícias*; 2007; 25 de Janeiro.
- [21] - Mckibben, B., *National Geographic*; 2007; 28 de Novembro.
- [22] - http://www.pt.sgs.com/pt/sgs_global_18.pdf; consulta: 10/04/2008.
- [23] - Khan, A., K.; *Research into Biodiesel Kinetics & Catalyst Development*; Brisbane – Australia, 2002.
- [24] - Scragg, A. A.; Morrison J.; The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine; *Enzyme and Microbial Technology* 33; 2003; 884–889.
- [25] - www.biodieselbr.com; consulta: 30/06/2008.
- [26] - Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry; *Fats and Fatty Oils*; Vol.A10; 1992, 173-244;
- [27] - Nye; Conversion of Used Frying Oil to Diesel Fuel by Transesterification: Preliminary Tests; 60 (8); 1983; 1598-1601.
- [28] – Schuchardt, U.; Sercheli, R. V & Matheus R.; Transesterification of Vegetable Oils: a Review.
- [29] – Marchetti, J. M.; Errazu, A.F.; Possible methods for biodiesel production; *Renewable and sustainable Energy Reviews*; 11; 2007; 1300-1311.
- [30] – Gerpen, J. V.; Shanks B.; Pruszko R.; Clements D.; Knothe, G.; *Biodiesel Production Technology*; 2002; August – January 2004; July 2004.
- [31] – www.ec.gc.ca/transport/publications/biodiesel/biodiesel4.htm ; consulta: 23/04/2008.
- [32] – Knothe, G.; Gerpen, J.; V.; Krahel, Jürgen; *The Biodiesel Handbook*; 2004; 4 de Novembro.
- [33] - Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry, *Glycerol*, 1992, Vol. A12, 477-489.
- [34] - Sheeham A.; *An Overview of Biodiesel and Petroleum Diesel Life Cycles*; National Renewable Energy Laboratory, 1998.
- [35] – Isso, Mamoru; Chen, Maoxue; Masashi, Eguachi; Kudo, Takashi; Shrestha, Suerekha; Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16; 2001; 53–58.

- [36] - Knothe, G.; Dunn, R. O.; Bagby, M. O.; Biodiesel: The use of Vegetable Oils and Their Derivatives as Alternative Diesel Fuels; National Center for Agricultural Utilization Research, U.S. Department of Agriculture.
- [37] - www.dallasgrp.com; consulta: 03/07/2008.
- [38] – www.filtertechnik.co.uk; consulta: 17/05/2008.
- [39] – Decreto-Lei nº 140/2004 de 8 de Junho;Diário da República.
- [40] - EN 14214 – Combustíveis Automóveis – Ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME).
- [41] - Teixeira, C.M.; Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel.
- [42] - Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry; *Fats and Fatty Oils*; Vol.A10; 1992, 245-276.
- [43] - Mckibben, B., National Geographic; 2007;Novembro; 11-12.
- [44] - <http://www.lipidlibrary.co.uk/>; consulta: 13/03/2008.
- [45] - Mckibben, B., National Geographic; 2007; Novembro; 27-28.
- [46] – Chisti, Y.; Biodiesel from microalga; Biotechnology; 25; 2007; 294-306.
- [47] – Illman, A.M; Scragg, A.H; Shales, S.W; Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen médium; Enzyme and Microbial Technology 27; 2000; 631–635.
- [48] – Lavens, P.; Sorgeloos, P.; Manual on the productions and use of live food for aquaculture; 1996.
- [49] – Isik, O.; Sarihan, E.; Kusvuran, E.; Gul, O.; fatty acid composition of the Chlorella *vulgaris*; Aquaculture 174_1999;299–311.
- [50] – Petkov, G.; Garcia, G.; Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*; Biochemical Systematics and Ecology 35; 2007;281 e 285.
- [51] - www.oilgae.com/algae/oil/extract/extract.html; consulta: 28/03/2008.
- [52] – <http://high-tech-industry.com/oil-extruder2.shtml>; consulta: 15/03/2008.
- [53] – Perry, R.H.; Green,W.D.; Perry’s Chemical Engineer’ Handbook; Mc Graw Hill; 7ª edição; 1999.
- [54] – Flich, E.W.; Industrial Solventes Handbook; Noyes data corporation (USA); 5ª edição;1998.
- [55] - Morrison, R.T.; Boyd, Robert Neilson; Fundação CALoust Gulbenkian; 1990.

- [56] – Fajardo, A.R.; Cerdán, L. E.; Medina, A. R.; Fernández, F., G. A.; Moreno, P.A. G.; Grima, E.M.; Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*.; Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería, Almería, Spain; Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109; 2007;120–126.
- [57] - <http://www.oilgae.com/algae/oil/extract/extract.html>, consulta: 22/03/2008.
- [58] – Lee, S.J.; Yoon, B.D; Oh, H.M.; Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*; Biotechnology Techniques, Vol 12, No 7; 1998; July, 553–556.
- [59] – Isik, O.; Sarihan, E.; Kusvuran, E.; Gul, O.; Erbatur, O.; Comparison of the fatty acid composition of the freshwater fish larvae *Tilapia zillii*, the rotifer *Brachionus calyciflorus*, and the microalgae *Scenedesmus abundans*, *Monoraphidium minimum* and *Chlorella vulgaris* in the algae-rotifer-fish larvae food chains; Aquaculture 174; 1999;299–311.
- [60] – Lin, Y.H.; Chang, F.L.; Tsao, C.Y.; Leu, J.Y.; Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor; Biochemical Engineering Journal 37; 2007;166–176.
- [61] – Pernet, F.; Tremblay, R.; Dermers, E.; Roussy, M.; Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. Grown in a semicontinuous system; Aquaculture 221; 2003; 393–406.
- [62] - <http://www.cyberlipid.org/extract/extr0005.htm> consulta: 05/07/2008.
- [63] - Less, M.; Standley, G.H.; A simple method isolation and purification of total lipides from animal tissues; 1956;23 de Agosto.
- [64] – Andrich, G.; Nesti, U.; Venturi, F.; Zinnai, A.; Fiorentini, R.; Dipartimento di Chimica e Biotecnologie Agrarie, Università di Pisa, Pisa, Italy; Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis* sp.; Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107; 2005; 381–386.
- [65] - Aresta, M.; Dibenedetto, A.; Carone, M.; Colonna, T.; Fragale, C.; Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO₂ extraction and thermochemical liquefaction; Received: 28 September 2005 / Accepted: 30 October 2005 / Published online: 29 November 2005
- [66] – Projecto de Norma Europea prEN 14214, Automotive Fuels – Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engine – Requirements and test methods; CEN – European Committee for Standardization, Outubro de 2002;

Anexos

Protocolo 1

Disponível no site <http://www.ccap.ac.uk/media/documents/MWC.pdf> (Janeiro 2008)
da Culture Collection of Algae Protozoa SAMS Research Services da Escócia



media recipes

MWC (Modified WC Medium)

Freshwater algae

Stocks	per litre
(1) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36.80 g
(2) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37.00 g
(3) NaHCO_3	12.60 g
(4) $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	11.40 g
(5) NaNO_3	85.00 g
(6) $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	21.20 g
(7) Combined trace elements:	
EDTANa ₂	4.36 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.022 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.18 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.006 g
H_3BO_3	1.00 g
(8) Vitamin mix:	
Thiamine HCl	0.1 g
Biotin	0.0005 g
Cyanocobalamin	0.0005 g
(9) Buffer (add dry when making up medium):	per litre final medium
TES	0.115 g
Medium	per litre
Stock solutions 1 - 8	1.0 ml each
Dry Buffer (9)	0.115 g

Combine stock solutions 1-8 and the dry buffer and make up to 1 litre with deionized water. Autoclave at 15 psi for 15 minutes.

Reference

Guillard RRL & Lorenzen CJ (1972) Yellow-green Algae with Chlorophyllide C. J. Phycol. **8**, 10-14.

Protocolo 2

Disponível no site http://www.ccap.ac.uk/media/documents/3N_BB_M_V_000.pdf (Janeiro 2008) da Culture Collection of Algae Protozoa SAMS Research Services da Escócia.



3N-BBM+V (Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen and Vitamins; modified)

Stock solutions in g / 1000 ml water	for 1 litre final medium
(1) 25.0 g NaNO_3	30.0 ml
(2) 2.5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10.0 ml
(3) 7.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.0 ml
(4) 7.5 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	10.0 ml
(5) 17.5 g KH_2PO_4	10.0 ml
(6) 2.5 g NaCl	10.0 ml
(7) trace element solution (see below)	6.0 ml
(8) vitamin B_1 (see below)	1.0 ml
(9) vitamin B_{12} (see below)	1.0 ml

Make up to 1 litre with distilled water. For agar add 15 g per litre Bacterial Agar. Autoclave at 15 psi for 15 minutes.

Trace element solution (7)

Add to 1000 ml of distilled water 0.75 g Na_2EDTA and the minerals in exactly the following sequence:

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	97.0 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	41.0 mg
ZnCl_2	5.0 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.0 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.0 mg

Vitamin B_1 (8)

0.12 g Thiaminhydrochloride in 100 ml distilled water. Filter sterile.

Vitamin B_{12} (9)

0.1 g Cyanocobalamin in 100 ml distilled water, take 1 ml of this solution and add 99 ml distilled water. Filter sterile.

media recipes